



Modulation des cellules dendritiques et macrophages : implications dans le cancer et l'athérosclérose

Daniela Meszaros Lakomy

► To cite this version:

Daniela Meszaros Lakomy. Modulation des cellules dendritiques et macrophages : implications dans le cancer et l'athérosclérose. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2010. Français. NNT : 2010DIJOMU04 . tel-00938649

HAL Id: tel-00938649

<https://theses.hal.science/tel-00938649>

Submitted on 29 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
U.F.R DE MEDECINE

ANNEE 2010

N° ATTRIBUE PAR LA BIBLIOTHEQUE

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE
DISCIPLINE : MEDECINE
SPECIALITE : IMMUNOLOGIE

PAR

MESZAROS (épouse LAKOMY) DANIELA

LE 16 DECEMBRE 2010

**MODULATION DES CELLULES DENDRITIQUES ET
MACROPHAGES : IMPLICATIONS DANS LE CANCER ET
L'ATHEROSCLEROSE**

Directeur de thèse

Pr. Bernard Bonnotte

MEMBRES DU JURY

Pr MARIE-CHRISTINE BENE

Dr JEAN-FRANCOIS FONTENEAU

Pr CATHERINE VERGELY

Pr ESTELLE SEILLES

Dr LAURENT LAGROST

Pr BERNARD BONNOTTE

RAPPORTEUR

RAPPORTEUR

EXAMINATEUR

EXAMINATEUR

EXAMINATEUR

DIRECTEUR DE THESE

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à adresser mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs obligations professionnelles.

Je remercie Mme le Pr Marie-Christine Béné d'avoir accepté d'analyser mon travail aussi rapidement, en tant que rapporteur.

J'exprime toute ma gratitude au Dr Jean-Francois Fonteneau d'avoir pris du temps pour juger ce travail en tant que rapporteur et, de m'avoir fait découvrir, lors de nos expériences sur les lymphocytes, un univers de la recherche que je ne connaissais pas.

Je tiens à remercier Mme le Pr Catherine Vergely, pour la gentillesse, la disponibilité et l'aide essentielle dans le dosage de peroxy-nitrite.

Je remercie Mme le Pr Seilles pour l'intérêt porté à ce travail.

Je remercie le Dr Laurent Lagrost de présider ce jury. J'ai eu la chance de travailler à tes côtés et de voir en toi un modèle.

Je souhaite remercier M le Pr Bernard Bonnotte, mon directeur de thèse, de m'avoir accepté au sein de son équipe. Merci de m'avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant, les cellules dendritiques, sur lequel il y a tant à découvrir encore.

Je souhaite remercier tous les chercheurs de l'unité INSERM U866. Un grand merci aux autres titulaires de l'unité et plus particulièrement Arlette, Anabelle et André pour leurs conseils et leur aide technique ; sans oublier Annie Fromentin qui profite déjà de sa retraite.

Je n'oublie pas les étudiants, ceux qui ont déjà quitté l'unité et ceux qui y travaillent encore, tous ceux avec qui j'ai pu échanger des idées, des « petites recettes » et souvent une place en salle de culture. Je tiens à remercier plus particulièrement Alex Morizot qui s'est toujours montré disponible, prêt à partager ses connaissances et à donner un coup de main.

Un grand merci à toute l'équipe dont je fais partie : Jennifer, Malika, Nona, Marion, Maxime, Sylvain, Julien. J'ai appris beaucoup de choses avec vous et je vous souhaite à tous, bon courage pour la suite et beaucoup de réussite dans vos projets.

J'adresse un énorme merci à toutes les personnes de l'hôpital avec qui je travaille, à tous les techniciens de laboratoire, qui me soutiennent et que j'apprécie particulièrement. Mes sincères hommages au Laboratoire d'Immunologie et surtout à M. Olsson pour son soutien et ses conseils. Un chaleureux merci et toute ma gratitude au Laboratoire de Biochimie Spécialisée, à Mme Frigère, à Mme Lemaire-Ewing, à M Guillard pour leurs remarques pertinentes, leur aide, leur disponibilité...

RESUME

Au cours de ma thèse, j'ai étudié la fonction cytotoxique des cellules dendritiques (DC) de patients cancéreux comparée à celle de sujets sains. Nous avons montré que les DC générées à partir des monocytes du sang périphérique peuvent acquérir des capacités cytotoxiques importantes après activation par des faibles doses de LPS. Le potentiel cytotoxique des DC générées à partir de patients cancéreux est comparable à celui de sujets sains. Nous avons identifié le mécanisme de cytotoxicité qui fait intervenir la production de peroxy-nitrite. Après avoir tué les cellules tumorales, les DC phagocytent des fragments tumoraux, surexpriment des molécules de costimulation et induisent la prolifération des lymphocytes.

Un deuxième axe de recherche au cours de ma thèse a consisté en l'étude des macrophages inflammatoires et de leur implication dans l'athérosclérose. Les macrophages sécrètent la CETP (cholesteryl ester transfert protein), protéine-cible des récepteurs LXR (liver X receptor). Nous avons montré que l'expression de la CETP, en réponse aux agonistes LXR, n'est pas augmentée dans les macrophages inflammatoires. Ceci suggère que les macrophages inflammatoires ne participeraient pas à l'augmentation du pool plasmatique de CETP en cas de traitement par des agonistes LXR.

Mots-clés : cellules dendritiques, cancer ; macrophages, athérosclérose.

Abstract

During my thesis, I studied the cytotoxic function of dendritic cells (DC) from cancer patients and compared it to DC from healthy donors. Our results indicate that human monocyte-derived DC can acquire strong cytotoxic activity toward tumor cells after activation with low dose of LPS. The cytotoxic potential of DC derived from cancer patients was almost the same as the one generated from healthy donors. We identified the tumor cell killing mechanism which involves peroxynitrite release. After killing of cancer cells, DC are capable of engulfing dead tumor cell fragments and overexpress the costimulatory molecules necessary for T cell proliferation.

A second study consisted in an analysis of inflammatory macrophages and their significance in atherosclerosis. Macrophages produce CETP (cholesteryl ester transfer protein), a target for LXR (liver X receptor) receptors. Our results show that LXR-mediated induction of CETP expression is lost in inflammatory macrophages. Our study suggests that inflammatory macrophages may not increase the circulating CETP pool on LXR agonist treatment.

Keywords: dendritic cells; cancer; macrophages; atherosclerosis.

Table des matières

INTRODUCTION.....	9
BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES	11
1. Découverte des cellules dendritiques	11
2. Origine des cellules dendritiques	12
3. Sous-types de cellules dendritiques.....	13
4. Recrutement des cellules dendritiques	16
5. Reconnaissance des antigènes par les cellules dendritiques	18
6. Maturation des cellules dendritiques.....	20
7. Migration des cellules dendritiques	23
8. Apprêtement et présentation des antigènes par les cellules dendritiques	24
9. Activation des lymphocytes par les cellules dendritiques.....	27
10. Induction de la tolérance immunologique par les cellules dendritiques	30
11. Fonctions des cellules dendritiques.....	32
CELLULES DENDRITIQUES ET CANCER	35
1. CELLULES DENDRITIQUES ET REPOSE IMMUNITAIRE	
ANTITUMORALE	35
1.1. Concept d' « immunoediting »	35
1.2. Cellules dendritiques et immunosurveillance des cancers.....	39
1.3. Cellules dendritiques et échappement tumoral	42
2. CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS	48
2.1. Argumentaire.....	48
2.2. Vaccins tumoraux à base de cellules dendritiques	48
2.3. Génération des cellules dendritiques pour les vaccins antitumoraux	49
2.4. Cellules dendritiques et essais cliniques	52
LES CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES.....	56
1. Cellules dendritiques cytotoxiques chez le rat	57
2. Cellules dendritiques cytotoxiques chez la souris.....	58
3. Cellules dendritiques cytotoxiques chez l'homme.....	59
3.1. Activité cytotoxique des DC humaines isolées du sang périphérique.....	60
3.2. Activité cytotoxique des DC humaines générées ex vivo	60
LES MACROPHAGES.....	68
1. Généralités	68
2. Mécanismes immunologiques et inflammatoires de l'athérosclérose.....	71
3. Les macrophages dans l'athérosclérose	74
CONCLUSION	80
BIBLIOGRAPHIE	100

Liste des figures

Figure 1 : L'origine et les étapes du développement des DC	p12
Figure 2 : Voies de migration des DC	p14
Figure 3 : Les principaux sous-types des DC	p15
Figure 4 : Les différents TLR	p19
Figure 5 : Les interactions entre les DC et l'immunité innée et adaptative	p21
Figure 6 : Les deux étapes de maturation des DC	p22
Figure 7 : L'expression différentielle des récepteurs de chimiokines lors de la maturation	p24
Figure 8 : Voies d'apprêtement des Ag	p26
Figure 9 : Les signaux d'activation des lymphocytes	p28
Figure 10 : Conséquences de la production des Treg en fonction de l'environnement local	p31
Figure 11A : Fonctionnement général des DC	p32
Figure 11B : Rôle des DC dans l'immunité antitumorale	p32
Figure 12 : Les trois phases de « l'immunoediting »	p36
Figure 13 : Participation des cellules de l'immunité innée et adaptative à la phase d'élimination des tumeurs	p37
Figure 14 : Les différents mécanismes d'induction de la tolérance	p46
Figure 15 : L'effet immunosuppresseur des tumeurs	p47
Figure 16 : Les stratégies de vaccination à base de DC	p49
Figure 17 : Les principales méthodes utilisées pour générer des DC dans un but thérapeutique	p50
Figure 18 : Rôle potentiel des DC cytotoxiques dans la réponse immunitaire antitumorale	p66
Figure 19 : Les principaux types de macrophages	p69
Figure 20 : Les cytokines produites dans l'environnement des macrophages influencent leur fonction	p70
Figure 21 : L'infiltrat inflammatoire et immunitaire dans les lésions d'athérosclérose	p72
Figure 22 : Hétérogénéité des macrophages au niveau de la lésion athéromateuse	p75
Figure 23 : Le transport reverse du cholestérol	p77
Tableau 1 : Synthèse des résultats des essais cliniques	p53
Tableau 2 : Les DC cytotoxiques	p65

Introduction

INTRODUCTION

“DC and macrophage biologists don’t talk with each other enough. Indeed, if a cell is called DC in a paper, I think that it is less likely that a macrophage biologist will read it and vice versa.”

Randolph GJ. Nat Rev Immunology 2010;10:453

Lors de mes années de recherche j’ai eu la chance de travailler dans deux équipes et d’étudier deux facettes différentes de ces cellules de la réponse immunitaire innée aux multiples propriétés qui sont appelées **cellules dendritiques et macrophages**. Ce travail, riche et interactif, m’a permis d’avoir un état d’esprit ouvert et d’analyser une situation sous différents angles en étudiant ces cellules dans deux contextes différents : le cancer et l’athérosclérose.

Dans l’équipe du Pr. B. Bonnotte, spécialisée dans la réponse immunitaire antitumorale, nous avons analysé les caractéristiques et le rôle cytotoxique des cellules dendritiques et leur implication dans le cancer. J’étais plus particulièrement responsable de l’étude de ces cellules chez l’homme, étude qui venait compléter les données obtenues dans notre équipe chez le rat et la souris.

Dans l’équipe du Dr. L. Lagrost, spécialisée dans l’étude des lipoprotéines et de leurs interactions cellulaires, nous avons étudié l’influence de l’inflammation sur les macrophages humains et murins et son impact potentiel sur l’équilibre des lipoprotéines et sur l’athérosclérose.

Dans le premier chapitre, les caractéristiques principales des cellules dendritiques (plus particulièrement les cellules dendritiques myéloïdes) seront rappelées. Un deuxième chapitre présentera les effets, positifs et négatifs, des cellules dendritiques sur la réponse immunitaire antitumorale. Le troisième chapitre exposera les données existantes sur une propriété encore peu connue des cellules dendritiques, la cytotoxicité. Le quatrième chapitre sera consacré à l’implication des macrophages dans l’athérosclérose. Enfin, en m’appuyant sur les publications issues de ce travail, je discuterai les résultats obtenus.

Chapitre I.

BIOLOGIE DES CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques (DC) représentent une population hétérogène de cellules ayant comme origine des précurseurs médullaires. Deux grands sous-types sont individualisés qui diffèrent sur les plans phénotypique et fonctionnel, les DC myéloïdes (DCm) et les DC plasmacytoïdes (DCp). Elles sont spécialisées dans la capture, le transport, l'apprêtement et la présentation des antigènes (Ag) aux lymphocytes T (LT). Elles sont réparties dans tout l'organisme, sont dotées de capacité de migration, et de ce fait peuvent se déplacer du site de capture des Ag vers les sites d'interactions cellulaires. Les DC représentent le lien entre l'immunité innée et l'immunité spécifique adaptative. Depuis plusieurs décennies, les DC sont considérées comme les médiateurs essentiels de l'immunité et de la tolérance (Banchereau et *al.*, 1998 ; Steinman et *al.*, 2003).

1. Découverte des cellules dendritiques

Les DC ont été découvertes dans la fraction de cellules mononucléées des préparations de rate de souris (Mosier et *al.*, 1967) et distinguées des monocytes et macrophages par leur morphologie unique (Steinman et *al.*, 1973 ; Steinman et *al.*, 1974). La morphologie typique des DC a été un critère de découverte mais aussi de mise au point de techniques d'enrichissement et d'isolement (van Voorhis et *al.*, 1982). Ces techniques ont permis par la suite la caractérisation fonctionnelle et la mise en évidence des marqueurs des DC (Nussenzweig et *al.*, 1981 ; Steinman et *al.*, 1978).

L'amélioration des techniques de purification des DC a permis de mieux comprendre leur fonctions et de découvrir leur importante capacité de stimulation des lymphocytes T (100 à 300 fois plus élevée que celle des cellules spléniques non fractionnées) et de capture et d'apprêtement d'antigène pour induire une réponse T effectrice (deux fois plus importante que celle des autres cellules) (Nussenzweig et *al.*, 1980 ; Steinman et *al.*, 1978).

Depuis leur découverte, grâce à leur rôle central dans le contrôle de l'immunité, les DC représentent des cibles potentielles dans de nombreux secteurs de l'immunologie clinique : transplantation, allergie, maladies auto-immunes, infections, tumeurs, vaccins.

2. Origine des cellules dendritiques

A la différence des lymphocytes, le programme de différenciation des DC chez l'homme commence seulement à être déchiffré.

Les DC se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (Figure 1). Des expériences de transfert adoptif ont montré que la majorité des DC dérive d'un **progéniteur commun myéloïde** et partage une origine commune avec les monocytes et les polynucléaires (Liu et *al.*, 2010). Au cours du développement dans la moelle osseuse, une séparation s'opère vers la lignée monocyttaire et vers la lignée dendritique. Le progéniteur des DC, appelé CDP (*Common-DC Progenitor*) va générer des DC myéloïdes ou classiques et des DC plasmacytoïdes (Naik et *al.*, 2006).

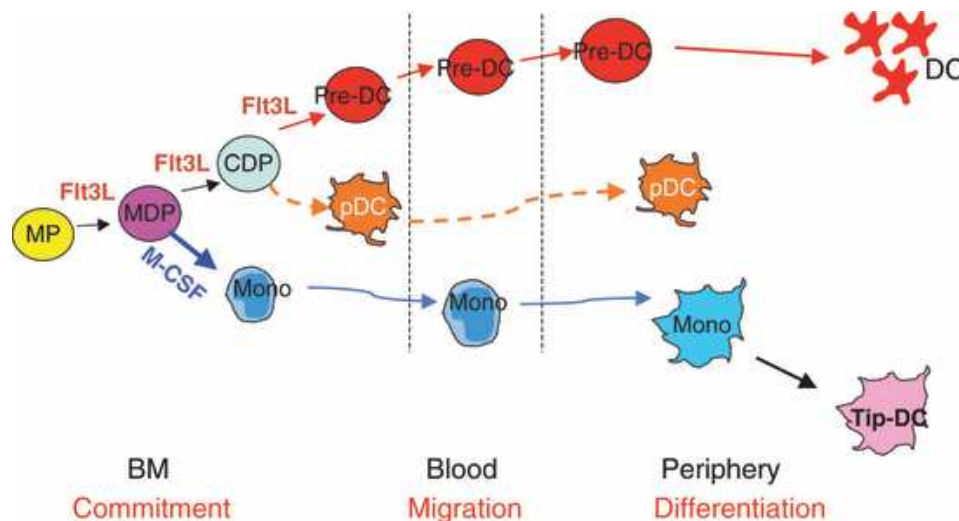


Figure 1: L'origine et les étapes du développement des DC (d'après Liu et *al.*, 2010).

Alors que les CDP sont localisées dans la moelle, les précurseurs des DC (pré-DC) qui en dérivent migrent de la moelle osseuse, via la circulation, dans les organes lymphoïdes, avec une durée de passage très courte dans la circulation. Les pré-DC vont donner naissance à plusieurs sous-types différents de DC dans les organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques). A l'état basal, en plus des organes lymphoïdes, les pré-DC contribuent au développement des cellules dendritiques $CD103^+$ (*Cluster of Differentiation*) dans les organes non lymphoïdes comme l'intestin, le rein, les poumons ou le foie (Liu et *al.*, 2010).

L'homéostasie des DC dans les organes est maintenue grâce à un équilibre dynamique entre trois paramètres : un enrichissement continu par les pré-DC circulantes, la prolifération *in situ*, limitée, et la mort cellulaire (Liu et *al.*, 2010).

Les facteurs de croissance essentiels pour le développement normal de la lignée dendritique sont le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), le M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) et le Flt3L (*ligand du Fms-related tyrosine kinase-3*). Flt3L apparaît comme un facteur majeur pour l'homéostasie des DC à l'état basal. L'administration du Flt3L chez des volontaires sains augmente la quantité de DCm dans le sang de 48 fois et celle de DCp de 13 fois (Pulendran et *al.*, 2000). De la même façon, les souris déficitaires en Flt3 ou Flt3L ont un développement anormal des DC, alors que le développement des monocytes reste normal (McKenna et *al.*, 2000).

Malgré leur grande hétérogénéité, la majorité des DC a une origine commune. Les expériences récentes sur l'ontogénie des DC ont pu écarter l'hypothèse selon laquelle, à l'état basal, les monocytes participeraient à la génération des DC.

3. Sous-types de cellules dendritiques

Il existe plusieurs façons de classer les DC chez l'homme.

Classiquement, on les sépare en **DC plasmacytoïdes** et **DC myéloïdes**, appelées aussi DC conventionnelles ou DC classiques (Wu et *al.*, 2007).

- Les DC myéloïdes, $CD11c^+CD123^{low}$, sont considérées comme les cellules présentatrices d'Ag professionnelles, capables d'apprêtement et présentation d'Ag, de sécrétion de grande quantité d'IL-12 (interleukine), d'expression de molécules de costimulation. Elles regroupent toutes les caractéristiques nécessaires pour l'activation des LT $CD4^+$ et $CD8^+$.

- Les DC plasmacytoïdes, $CD11c^-CD123^{high}$, doivent leur nom à leur ressemblance morphologique avec les plasmocytes (Colonna et *al.*, 2004). A l'origine, elles étaient appelées « cellules productrices d'IFN (interféron) » du fait de leur capacité à produire de grandes quantités d'IFN α après activation. Elles circulent dans le sang et les organes lymphoïdes. Les DCp expriment le TLR-7 (*Toll-like receptor -7*) et le TLR-9 au niveau des endosomes, ce qui leur permet de reconnaître des acides nucléiques viraux et d'être des médiateurs importants de l'immunité antivirale. L'IFN α ainsi sécrété a une action inhibitrice directe sur la réplication virale mais il active aussi les fonctions antivirales des autres cellules comme les cellules NK

(*Natural Killer*). Les DCp sont aussi capables de présenter les Ag aux LT mais de façon moins efficace que les DCm. Leur activation chronique et la sécrétion de l'IFN de type I en dehors d'une infection peut aboutir au développement de maladies auto-immunes (Swiecki et *al.*, 2010).

Une autre nomenclature tient compte du **caractère résident ou migrateur des DC**.

- Les DC résidentes arrivent dans les organes lymphoïdes à partir du précurseur circulant et en général ne migrent pas vers d'autres sites. A l'état basal, elles présentent des Ag du soi et participent à la tolérance ou, en cas d'infection, elles capturent les Ag microbiens localement et induisent la prolifération des LT spécifiques.

- Les DC migratrices, après avoir quitté la moelle, vont infiltrer les tissus avant de rejoindre les organes lymphoïdes via les lymphatiques (Figure 2) (Coquerelle et *al.*, 2010 ; Ueno et *al.*, 2007).

Ainsi, les DCm existent *in vivo* dans plusieurs compartiments : les DC résidentes des organes lymphoïdes secondaires, les DC interstitielles, localisées dans les espaces interstitiels drainés par les vaisseaux lymphatiques afférents de nombreux organes, et les DC circulantes. Le rôle physiologique des DCm circulantes n'est pas clairement défini. Elles pourraient participer à la reconstitution du réservoir des DC résidentes, ou être des DC qui capturent des pathogènes circulants, ou les deux.

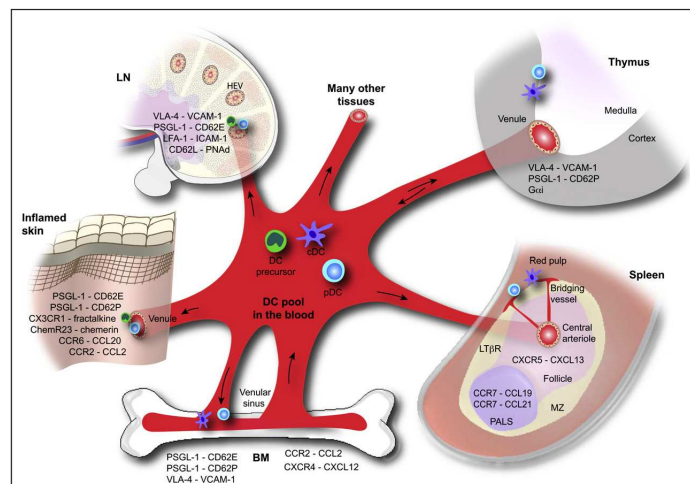


Figure 2 : Voies de migration des DC (d'après Alvarez et *al.*, 2008).

En fonction de leur **localisation anatomique**, plusieurs sous-types peuvent être identifiés ; chaque sous-type présente des fonctionnalités spécifiques (Ueno et *al.*, 2007 ; Coquerelle et *al.*, 2010) (Figure 3). Chaque sous-groupe de DC a des rôles distincts dans le contrôle du type de réponse immunitaire (Coquerelle et *al.*, 2010) et chaque sous-groupe

exprime des PPR (*Pattern Recognition Receptors*) différents pour la reconnaissance des microbes et des Ag (Kerrigan et *al.*, 2010).

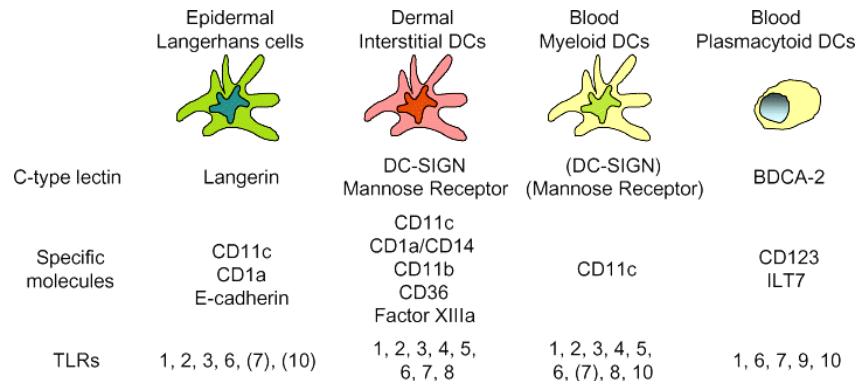


Figure 3 : Les principaux sous-types des DC (d'après Ueno et *al.*, 2007).

- Dans la peau, il existe deux types distincts de DC : les cellules de Langerhans dans l'épiderme et les DC interstitielles dans le derme. Elles expriment des panels différents de molécules de surface : CD1a, langérine, E-cadhérine pour les cellules de Langerhans, et DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule - ICAM3 grabbing non integrin*), CD11b et CD14 pour les DC interstitielles. Elles ont également des fonctions différentes. Les cellules de Langerhans ne proviennent pas des pré-DC mais plutôt d'un précurseur qui coloniserait la peau au cours du développement embryonnaire ; elles sont résistantes aux radiations ultraviolettes et peuvent se renouveler *in situ* (Chorro et *al.*, 2009). Les études des différents sous-types des DC, isolées de la peau et cultivées *in vitro* ou analysées *in vivo* chez la souris, montrent que les cellules de Langerhans sont très efficaces dans l'induction des LT CD8⁺ cytotoxiques de haute affinité et dans la polarisation des LT CD4⁺ naïfs, alors que les DC dermiques induisent la différenciation des cellules B naïves en plasmocytes sécréteurs d'IgM (immunoglobuline M) (Coquerelle et *al.*, 2010 ;Ueno et *al.*, 2007). Une nouvelle population de DC langérine⁺ qui réside dans le derme a été décrite récemment. Ces DC transitent dans le derme, capturent les Ag avant de migrer dans les ganglions lymphatiques et semblent être impliquées dans l'hypersensibilité de contact (Bursch et *al.*, 2007).

Dans la rate, il existe deux types principaux de DC : les CD8⁺DEC205⁺ situées dans la zone T, spécialisées dans la présentation des Ag par les molécules de classe I du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) et la présentation croisée, et les CD8⁻33D1⁺ détectées dans la

pulpe rouge et la zone marginale. Les deux types principaux de DC identifiés sur la base de l'expression de CD8 (DC CD8⁺ ou CD8⁻) ne sont observés que chez la souris.

Chez l'homme, le marqueur CD8⁺ ne peut pas être utilisé pour identifier ces sous-types de DC. En revanche, l'équivalent de la population CD8⁺ murine vient d'être identifié très récemment chez l'homme sur la base de l'expression de XCR1 (*XC chemokine receptor 1*), BDCA-3 'CD141) et CLEC9A (*C-type lectin-like receptor 9A*), ce qui donne lieu à un nouveau classement chez l'homme des populations de DC observées dans le sang : DC CD1c⁺, DC CD16⁺, et DC CD141⁺. Les DC CD141⁺ seraient alors l'équivalent humain des DC CD8⁺ murines et seraient les DC spécialisées dans la présentation croisée à partir de cellules mortes chez l'homme (Bachem et al., 2010, Crozat et al., 2010, Jongbloed et al., 2010, Poulin et al., 2010).

Dans la *lamina propria* de l'intestin, un sous-type de DC exprimant CD103 présente des fonctions régulatrices et migre à l'état basal dans les ganglions lymphatiques mésentériques, alors qu'un autre sous-type CX3CR1⁺ présente des activités pro-inflammatoires.

Le poumon est équipé d'un large réseau de DC au sein duquel on peut identifier également plusieurs sous-groupes.

Une nouvelle population de DC a été identifiée dans la rate des souris infectées par *Listeria monocytogenes*, les DC inflammatoires. Cette population apparaît dans des conditions inflammatoires, produit du TNFα (*Tumor Necrosis Factor*) et exprime iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*). Elle a été appelée TiDCp (*TNF/iNOS-producing DC*) et module la réponse immunitaire innée contre les infections bactériennes (Serbina et al., 2003).

Il existe donc plusieurs sous-types de DC, avec une classification qui peut tenir compte de l'origine, de la résidence, du phénotype ou des fonctions. Cela reflète une des caractéristiques essentielles de la lignée dendritique, leur hétérogénéité, permettant une spécialisation des fonctions adaptée au type d'agression et au microenvironnement, indispensable pour le fonctionnement immunitaire et indissociable de leur utilisation en thérapeutique.

4. Recrutement des cellules dendritiques

Les DC sont dotées de capacités migratrices. Chez l'homme, dans des conditions basales, les monocytes ne sont pas les précurseurs des DC des organes lymphoïdes, ni des DC CD103⁺ des tissus. En revanche, dans des conditions inflammatoires, les monocytes sont attirés au site

inflammatoire et gardent la plasticité de différenciation (Kang et *al.*, 2010). Diverses conditions de stress et d'inflammation vont attirer les monocytes, les DC et les précurseurs circulants vers le site inflammatoire.

Ce recrutement est une réponse à la production des chimiokines au site inflammatoire. **Les chimiokines** sont de petites cytokines secrétées, à fonction chimiotactique, qui régulent le trafic des leucocytes dans des conditions basales ou inflammatoires. Les DC immatures expriment un répertoire de récepteurs de chimiokines (CCR1, CCR2, CCR5, CCR6) (*CC Chemokine Receptor*) qui leur permettent de répondre à des chimiokines inflammatoires incluant CCL5, CCL2, CCL3, CCL4, CCL20 (*CC Chemokine Ligand*). Dans des conditions inflammatoires, un panel de chimiokines sera produit par des cellules résidentes et par des cellules endothéliales activées (CCL2, CCL5, CCL7, CCL13, CCL20, CCL22). Les DC elles-mêmes présentes au site inflammatoire vont constituer une source de chimiokines attirant d'autres effecteurs de la réponse immunitaire. Les cytokines inflammatoires, TNF α et IL-1, produites par les macrophages, vont contribuer à l'expression de récepteurs aux chimiokines et à la sécrétion des chimiokines inductibles pratiquement par toutes les cellules du site inflammatoire (Sozzani et *al.*, 2005).

Ainsi, l'induction de la sécrétion de la chimiokine MIP-3 α (*Macrophage Inflammatory Protein-3 α*)/CCL20 au cours du processus inflammatoire représente un mécanisme fondamental de chimiotactisme des DC immatures vers le site inflammatoire. Des expériences *in vitro* ont montré que les DC dérivées des précurseurs CD34⁺ répondaient fortement à MIP-3 α , via le récepteur CCR6, mais que cette chimiokine n'avait pas d'effet sur les DC dérivées des monocytes (Banchereau et *al.*, 2000).

Cette chimiokine joue probablement un rôle dans l'infiltration des tumeurs par les DCs immatures. Ainsi, des tumeurs mammaires sécrétant cette chimiokine sont fortement infiltrées par des DC immatures (Bell et *al.*, 1999). Dans un modèle de cancer du colon de rat la surexpression de MIP-3 α induit une très importante infiltration des tumeurs par des DC immatures sans permettre toutefois une réponse immunitaire antitumorale efficace (Bonnotte et *al.*, 2004). D'autres chimiokines sont aussi à l'origine du recrutement des DC au sein des tumeurs (Scarpino et *al.*, 2000). La chimiokine CCL3, surexprimée dans des tumeurs murines (induites par l'injection sous-cutanée des cellules tumorales B16-F10 ou de carcinome de poumon), favorise le recrutement des pré-DC montrant qu'elle pouvait être à l'origine des DC au site tumoral (Diao et *al.*, 2010).

De plus, les DC expriment une variété de récepteurs pour des **stimuli chimiotactiques autres que les chimiokines**, tels que les signaux de “danger tissulaire”. Ces stimuli sont produits rapidement (quelques minutes) au site inflammatoire et représentent le signal précoce permettant le recrutement des DC ou de leurs précurseurs. Il s’agit de molécules lipidiques bioactives, de composants dérivés des bactéries comme les peptides formylés, de composants du complément comme la fraction C5a, de substances antimicrobiennes comme les défensines (Sozzani et *al.*, 2005). Des signaux sont également délivrés par des cellules engagées dans la voie de mort cellulaire, comme les petites protéines de choc thermique, les HSP (*Heat Shock Protein*), libérées par les cellules nécrotiques ou l’acide urique (Pulendran et *al.*, 2004).

La connaissance des signaux qui gouvernent le recrutement des DC vers un site tumoral est indispensable pour moduler la réponse immunitaire. Plusieurs pistes thérapeutiques sont envisageables notamment en agissant sur la sécrétion des chimiokines par les cellules tumorales, sur l’expression des récepteurs de chimiokines par les DC, ou sur la modulation de la mort des cellules tumorales par des agents chimio- ou radiothérapeutiques, dans le but de délivrer des signaux de recrutement pour les DC.

5. Reconnaissance des antigènes par les cellules dendritiques

Les DC résident dans les tissus périphériques, notamment la peau et les muqueuses, sites stratégiques car portes d’entrée potentielles pour les pathogènes, où elles forment un **réseau sentinelle**. Ces DC sentinelles, dispersées dans la majorité de tissus, se trouvent dans un état **immature**. Dans cet état immature, les DC disposent d’une grande capacité à reconnaître et à capturer les Ag, mais elles sont de faibles activateurs des LT. Les DC immatures vont faire un échantillonnage permanent des Ag environnementaux et pourront être activées après avoir reçu **des signaux danger** (Ueno et *al.*, 2007).

Elles vont reconnaître les microbes grâce à des récepteurs pour certains motifs microbiens, des motifs moléculaires conservés communs aux pathogènes, les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Ces récepteurs des PAMP sont appelés **PRR** (*Pattern Recognition Receptors*) et sont de plusieurs types : les TLR, les CLR (*C-type lectin receptors*) et les NLR (*NOD-like receptors, intracytoplasmic Nucleotide Oligomerization Domain*) (Ueno et *al.*, 2007).

Une grande variété de cellules exprime des **TLR**. Il y a dix TLR identifiés chez l’homme et treize chez la souris. Les TLR 1, 2, 4, 5 et 6 sont exprimés à la surface cellulaire, alors que

les TLR 3, 7, 8 et 9 se trouvent dans des compartiments intracellulaires (Akira et *al.*, 2006). Chez l'homme, l'expression des TLR dépend du sous-type de DC, les DCp expriment les TLR 1, 6, 7, 9 et 10 et les DCm les TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 10 (Kadowaki et *al.*, 2001) (Figure 4).

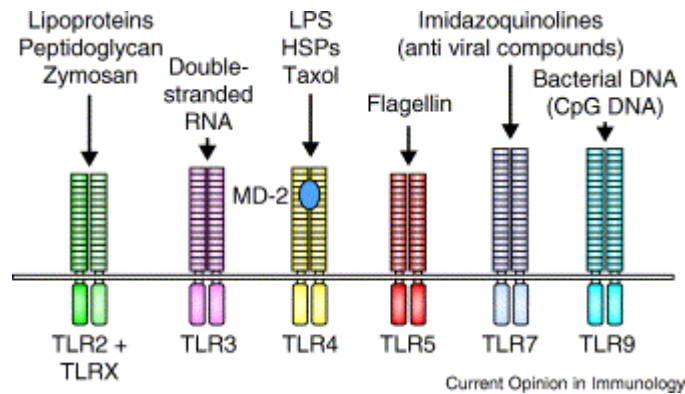


Figure 4 : Les différents TLR (d'après Akira et *al.*, 2003).

Les différents TLR reconnaissent des PAMP différents et leur engagement va entraîner une cascade spécifique de signalisation aboutissant à un profil d'expression de gènes. Les TLR délivrent des signaux moléculaires distincts engendrant un type différent d'activation des DC et donc une réponse immunitaire adaptée à l'agent infectieux (Kapsenberg et *al.*, 2003).

Les récepteurs **de type lectine C** sont des molécules se fixant sur la partie carbohydate des glycoprotéines (Geijtenbeek et *al.*, 2004). Différents sous-types de DC expriment différents CLR : BDCA2 (*Blood DC Antigen 2*) pour les DCp (Dzionek et *al.*, 2001), langérine/CD207 spécifique des cellules de Langerhans (Valladeau et *al.*, 2000), ou DC-SIGN pour les DC interstitielles (Geijtenbeek et *al.*, 2000). Les CLR jouent le rôle d'ancrage des divers agents pathogènes, mais aussi de molécules d'adhérence entre les DC et les autres types cellulaires (Ueno et *al.*, 2007).

Les récepteurs NLR représentent une famille de récepteurs reconnaissant des composants intracellulaires des microbes (Martinon et *al.*, 2005). Après la reconnaissance des PAMP, les NLR s'activent et ciblent des voies de signalisation des cytokines pro-inflammatoires (Ueno et *al.*, 2007).

D'autres produits, en plus des motifs moléculaires des pathogènes, peuvent être reconnus par les DC. L'observation expérimentale que les lysats des cellules mortes peuvent induire l'activation des DC générées *in vitro* a été à l'origine de l'idée que des composants des cellules mortes pouvaient activer les DC *in vivo* (Gallucci et *al.*, 1999). Ces molécules activatrices endogènes sont appelées **DAMP** (*damage-associated molecular pattern molecules*). Les DAMP incluent les HSP, les HMGB1 (*high-mobility group box 1 protein*), la β -défensine et l'acide urique. Ces molécules peuvent être reconnues par des TLR ou par d'autres récepteurs plus ou moins bien identifiés (Ueno et *al.*, 2007). L'HMGB1 est un facteur cytokine-like libéré par les cellules en voie de mourir et capable de se fixer sur des récepteurs multiples comme TLR-2, TLR-4 et RAGE (*receptor for advanced glycation end products*). Il induit une cascade de réponses inflammatoires en absence d'infection microbienne (Scaffidi et *al.*, 2002).

Après un contact microbien ou après stimulation par des cytokines inflammatoires, les DC vont **capturer les Ag** ainsi reconnus. Les DC immatures sont capables de capturer et d'apprêter une grande variété de molécules et de microorganismes. Elles peuvent utiliser différentes voies pour la capture de l'Ag : la macropinocytose, l'endocytose médiée par les récepteurs de type lectine C, par les récepteurs Fc γ de type I pour les complexes immuns et les particules opsonisées, ou la phagocytose pour les particules, les cellules nécrotiques ou apoptotiques, les virus ou les bactéries (Banchereau et *al.*, 2000).

Plusieurs études indiquent que les DC immatures ont la capacité de capturer des Ag tumoraux (Guermónprez et *al.*, 2002 ; Nouri-Shirazi et *al.*, 2000). Des récepteurs de type lectine C ont été rapportés comme capables de reconnaître des motifs de glycosylation des Ag spécifiques des tumeurs comme MUC1 (mucine1) (Saeland et *al.*, 2007).

Ces données suggèrent que les DC pourraient être capables de reconnaître certaines molécules tumorales et de participer à la capture et à l'internalisation des fragments issus des cellules tumorales. Cela peut avoir des conséquences très importantes pour l'activation des DC et, par conséquent, pour l'induction d'une réponse immunitaire.

6. Maturation des cellules dendritiques

Une fois l'Ag capturé, plusieurs événements vont s'enchaîner et se succéder dans la vie des DC. Ils vont aboutir à la maturation des DC, à l'apprêtement de l'Ag et, après migration, à la présentation de l'Ag aux LT.

Les DC peuvent reconnaître l'environnement de différentes façons et plusieurs moyens existent pour leur maturation. Lors du processus d'activation, elles interagissent avec d'autres effecteurs de l'immunité présents au site inflammatoire (Figure 5).

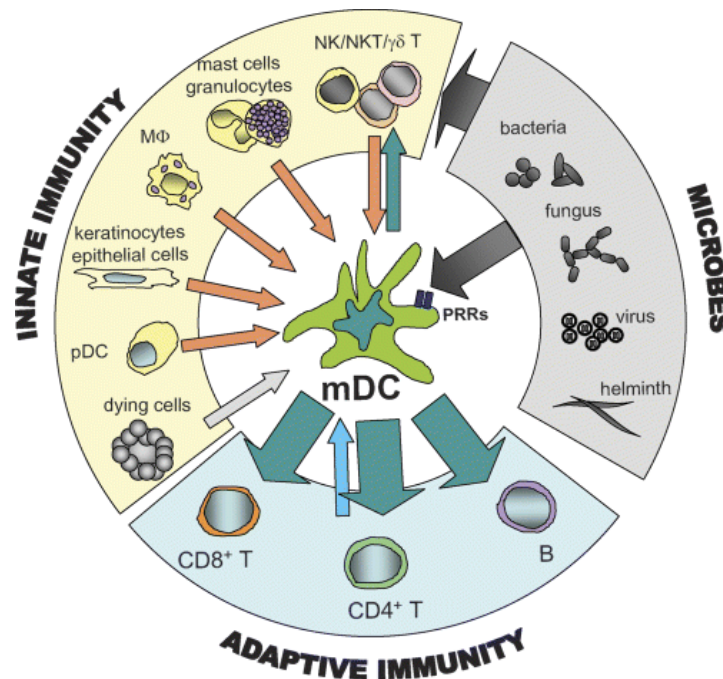


Figure 5 : Les interactions entre les DC et l'immunité innée et adaptative (d'après Ueno et *al.*, 2007).

L'invasion par les agents pathogènes aboutit à l'activation des effecteurs de l'immunité innée (neutrophiles, mastocytes, cellules NK, basophiles). Les DC sont sources de chimiokines participant à l'amplification de l'inflammation et au recrutement d'autres cellules au site inflammatoire. Très précocement, par l'intermédiaire des chimiokines, les effecteurs de l'immunité innée (NK et neutrophiles) vont être attirés au site inflammatoire, suivis par les monocytes et les LT mémoire. Les DC vont interagir avec les autres cellules immunitaires avec l'instauration d'un dialogue d'activation réciproque. Les DC interagissent et activent les cellules NK (Lucas et *al.*, 2007) et NKT (*Natural Killer T Cell*) (Fujii et *al.*, 2002) par l'intermédiaire de contacts cellulaires et des cytokines produites. Les DC en voie de

maturation vont produire de l'IL-12, cytokine cruciale pour l'activation des cellules NK. Les NK peuvent activer les DC via la production d'IFN γ . Les DC peuvent présenter des glycolipides par l'intermédiaire des récepteurs CD1d induisant l'activation des cellules NKT qui, à leur tour, peuvent augmenter la maturation des DC via l'interaction CD40-CD40L (Fujii et *al.*, 2002). En fonction de ces interactions et du microenvironnement cytokinique créé par les cellules du système immunitaire inné, les DC vont entrer dans un programme spécifique de maturation avec comme résultat final l'induction des différents types de réponses T. Les DC orchestrent donc les différents acteurs de l'immunité et de ce fait font le **lien entre l'immunité innée et adaptative** (Banchereau et *al.*, 2000 ; Ueno et *al.*, 2007). De nombreuses études ont montré que les DC ont la capacité unique de faire le lien entre les pathogènes envahissant les tissus périphériques et les organes lymphoïdes, lieu d'initiation de la réponse immune des lymphocytes. Des expériences *in vitro* (Schuler et *al.*, 1985) et *in vivo* (De Smedt et *al.*, 1996) ont clairement établi le passage d'un état immature (de capture d'Ag) à un état mature contemporain de leur migration dans les organes lymphoïdes et de leur colocalisation avec des LT (Coquerelle et *al.*, 2010).

Ce **processus de maturation** comprend plusieurs événements coordonnés : des changements de morphologie, de cytosquelette et de mobilité (Trombetta et *al.*, 2005), la perte de la capacité de phagocytose/endocytose et de sécrétion des chimiokines (Penna et *al.*, 2002), la surexpression des molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 et d'adhérence (Caux et *al.*, 1994), la translocation des complexes peptide-CMH à la surface de la cellule (Cella et *al.*, 1997), la sécrétion des cytokines qui vont polariser les effecteurs immunitaires (Heufler et *al.*, 1996) (Figure 6).

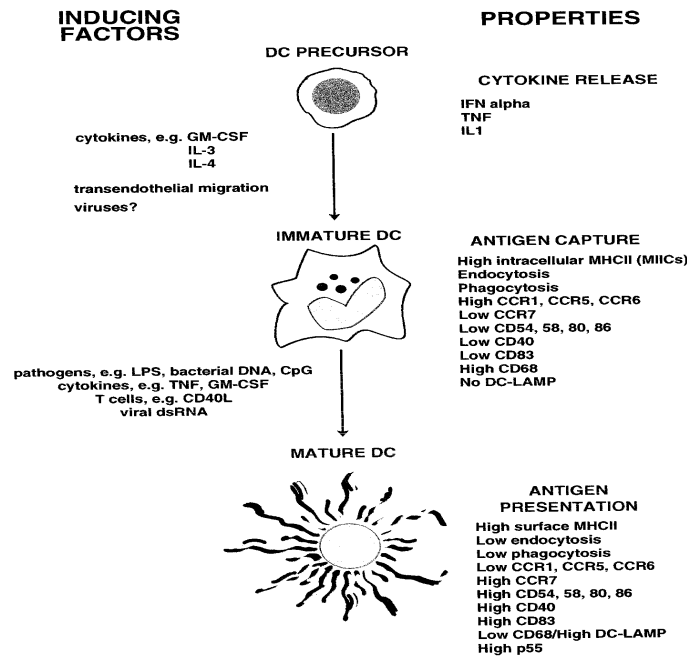


Figure 6 : Les deux étapes de maturation des DC (d'après Banchereau et *al.*, 2000).

Les propriétés immunostimulatrices des DC et leur capacité unique à activer de façon optimale les LT naïfs sont liées à leur capacité à exercer deux fonctions différentes dans deux états de différenciation distincts. Les changements phénotypiques et fonctionnels au cours de la maturation vont aboutir à la transformation d'une cellule capable de capturer des Ag en cellule présentatrice d'Ag. La maîtrise de la maturation des DC va représenter une étape clé dans la réussite des immunothérapies des cancers.

7. Migration des cellules dendritiques

Les agents pathogènes envahissent les tissus périphériques alors que les lymphocytes sont concentrés dans les organes lymphoïdes. Les DC, grâce à leur propriété de migration au cours de la maturation, font le lien entre la périphérie et les organes lymphoïdes secondaires. La bonne coordination entre la maturation et la migration des DC est une étape clé dans la sensibilisation des lymphocytes, car les DC matures vont présenter les Ag, exprimer les molécules de costimulation et sécréter les cytokines nécessaires pour l'activation des lymphocytes. L'activation des DC est suivie d'un changement radical dans le répertoire des récepteurs de chimiokines qu'elles expriment, et ce changement va permettre leur migration de la périphérie vers les ganglions lymphatiques (Banchereau *et al.*, 2000).

En effet, la maturation est associée à la diminution d'expression des **récepteurs de chimiokines** inflammatoires et l'expression *de novo* de CCR7 (Figure 7). Ce récepteur reconnaît deux chimiokines, CCL19 et CCL21, qui sont sécrétées dans la partie luminale des cellules endothéliales des zones riches en LT des organes lymphoïdes secondaires. De ce fait, les DC vont quitter les tissus inflammatoires et entrer dans la circulation lymphatique qui va les conduire vers les ganglions lymphatiques de drainage. CCR7 est le récepteur principal qui va orienter la migration des DC vers les compartiments riches en LT des ganglions (Randolph et *al.*, 2008). Le rôle crucial de CCR7 a été montré dans des expériences utilisant des souris CCR7^{-/-} ; ces souris présentaient une architecture défectueuse des ganglions et une altération du homing des DC et des lymphocytes (Forster et *al.*, 1999).

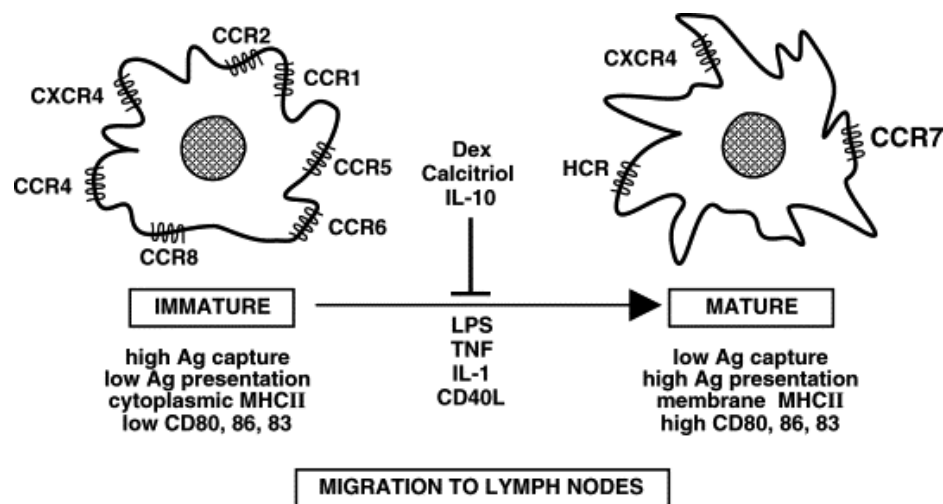


Figure 7 : L'expression différentielle des récepteurs de chimiokines lors de la maturation des DC (d'après Sozzani et *al.*, 2005).

Par conséquent, tous les facteurs qui vont interférer avec la migration des DC et notamment avec l'expression de CCR7 vont avoir des effets négatifs sur l'induction d'une réponse immunitaire efficace, en empêchant la rencontre des lymphocytes avec les DC.

8. Apprêtement et présentation des antigènes par les cellules dendritiques

Les DC peuvent capturer les Ag par différents mécanismes (phagocytose, macropinocytose, endocytose médiée par des récepteurs) permettant une présentation d'Ag même pour des concentrations très faibles. En revanche, une fois l'Ag capturé, la capacité de

capture des DC diminue, et l'Ag entre dans un processus d'apprêtement. A la différence des lymphocytes B qui peuvent reconnaître des Ag natifs, les lymphocytes T ont besoin que les Ag soient apprêtés et présentés par des cellules présentatrices d'Ag. Pour que les Ag puissent être reconnus par les lymphocytes T, les DC doivent les transformer en peptides et les présenter sous forme de complexes peptide-CMH. La conversion des protéines antigéniques en peptides immunogéniques reconnaissables par les LT implique une série d'événements protéolytiques et enzymatiques aboutissant à la formation des complexes peptide-CMH. Les DC peuvent apprêter des Ag exogènes (bactéries, virus, cellules nécrotiques ou apoptotiques, complexes immuns) mais aussi des Ag endogènes (par exemple des Ag synthétisés dans le cytosol).

Les **protéines antigéniques cytosoliques** sont d'abord ubiquitinylées, puis dégradées en peptides par le protéasome, dans le cytosol. Les peptides sont transportés par l'intermédiaire d'un transporteur TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) dans le réticulum endoplasmique et délivrés aux molécules de classe I du CMH nouvellement synthétisées. Les complexes peptide-CMH I sont transportés depuis le réticulum endoplasmique, à travers le réseau golgien, à la surface de la cellule et présentés aux LT CD8⁺. Les signaux de maturation vont activer les protéines qui contrôlent l'ubiquitinylation des protéines antigéniques permettant leur dégradation par le protéasome et vont augmenter la durée de vie des molécules de classe I du CMH (Banchereau et *al.*, 2000 ; Guermonprez et *al.*, 2002).

Les **Ag exogènes** sont apprêtés dans les vésicules endosomales. Les endosomes fusionnent avec les lysosomes et les protéases lysosomales dégradent les protéines antigéniques en peptides qui vont être ensuite associés aux molécules de classe II du CMH. Cette association fait suite à la dégradation par voie enzymatique dépendante des cathepsines de la chaîne invariante des molécules de classe II du CMH. La maturation s'accompagne d'une augmentation de la synthèse et d'une accumulation en grande quantité des molécules du CMH dans les compartiments lysosomaux. Les complexes peptide-CMH II sont ensuite transportés à la surface de la cellule et présentés aux LT CD4⁺. Cette présentation finement régulée n'est pas fonctionnelle quand les DC sont dans un état immature. A ce stade, les molécules de classe II du CMH ne sont pas disponibles car liées à la chaîne invariante, la dégradation enzymatique des Ag n'est pas efficace, et les complexes peptide-CMH formés sont exprimés de façon instable à la surface de la cellule (Banchereau et *al.*, 2000 ; Guermonprez et *al.*, 2002).

Des Ag exogènes peuvent également être apprêtés et présentés associés aux molécules de classe I du CMH, phénomène appelé **présentation croisée**. Cela permet de stimuler des LT CD8⁺ en réponse à des Ag exogènes. Ce processus est rendu possible par un mécanisme d'échappement des protéines depuis les vésicules endosomales dans le cytosol, suivi de leur pénétration dans le réticulum endoplasmique en utilisant des voies TAP-dépendantes ou indépendantes. Un autre mécanisme pourrait être un recyclage des molécules de classe I du CMH via les compartiments d'endocytose (Banchereau et *al.*, 2000 ; Guernonprez et *al.*, 2002 ; Den Haan et *al.*, 2000).

Les **Ag lipidiques** sont présentés associés à des molécules CD1 qui s'hétérodimérisent avec la β 2-microglobuline et qui ont une structure similaire aux molécules de classe I du CMH. Le répertoire restreint aux CD1d inclut les cellules NKT. Ces cellules peuvent reconnaître des galactosylcéramides et des gangliosides dérivés des cellules tumorales (Adams et *al.*, 2005).

Les différentes voies de capture des Ag et de présentation antigénique font l'objet d'intenses études dans le but d'utiliser ces voies d'une manière optimale dans les essais cliniques à base de DC (Figure 8) (Tacken et *al.*, 2007).

La capacité de phagocytose et de présentation croisée des Ag tumoraux a été rapportée par plusieurs équipes (Berard et *al.*, 2000 ; Nouri-Shirazi et *al.*, 2000 ; Russo et *al.*, 2000). Des exosomes, petites vésicules membranaires secrétées par les cellules tumorales, contiennent des Ag tumoraux et leur capture peut aboutir également à la présentation croisée (Wolfers et *al.*, 2001).

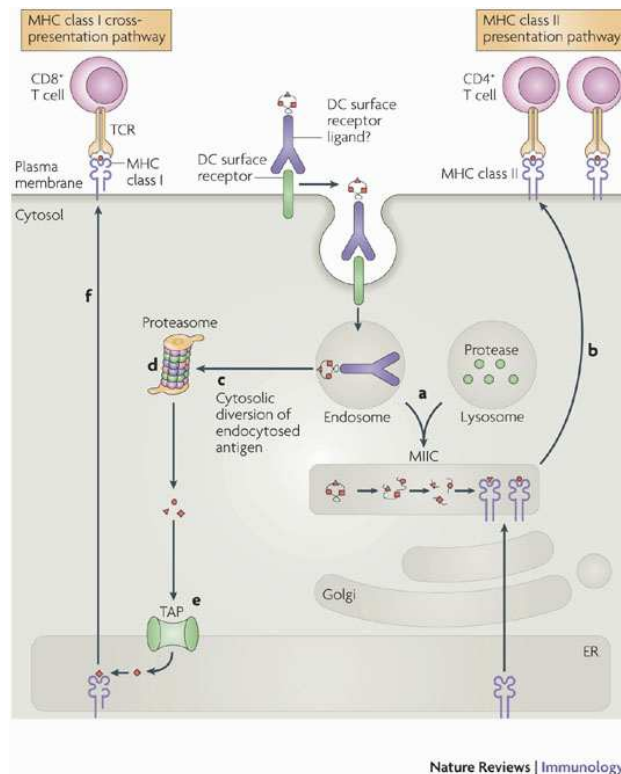


Figure 8 : Voies d'apprêtement des Ag (d'après Tacke et *al.*, 2007).

La maturation confère aux DC la capacité de présenter dans les organes lymphoïdes des Ag capturés auparavant en périphérie. Cette capacité repose sur une régulation unique d'apprêtement des Ag conduisant à une présentation des complexes peptide-CMH. Ainsi des DC peuvent présenter des Ag tumoraux aux lymphocytes T.

9. Activation des lymphocytes par les cellules dendritiques

Les DC matures ont donc toutes les propriétés pour stimuler efficacement les lymphocytes T. Après avoir capturé et apprêté les Ag et après avoir migré dans les régions riches en lymphocytes, elles expriment en grande quantité à leur surface des complexes peptide-CMH ainsi que des molécules de costimulation. Elles vont ainsi pouvoir délivrer aux lymphocytes T des signaux d'activation, de prolifération et de différenciation (Ueno et *al.*, 2007 et *al.*). L'interaction DC-lymphocyte implique un dialogue dans les deux sens qui fait intervenir la reconnaissance du peptide par le récepteur T (TCR : *T cell receptor*) associé à la machinerie de signalisation CD3, les molécules du CMH, les molécules de costimulation et les molécules d'adhérence. Les DC vont intervenir dans ce dialogue comme activateurs mais aussi comme régulateurs de la réponse immunitaire car elles vont polariser les lymphocytes T et les orienter

vers la voie de différenciation la plus adaptée à l'agression. L'activation efficace des LT va aboutir à leur expansion clonale et à leur différenciation en **cellules effectrices** et en **cellules mémoire**. Une interaction avec des DC matures est nécessaire pour une survie à long terme des LT et la différenciation en cellules mémoire.

Pour l'induction d'une immunité efficace, **trois signaux d'activation** sont nécessaires. Le premier signal d'activation va être apporté par l'interaction entre le complexe peptide-CMH et le TCR. Les molécules d'adhérence vont stabiliser l'interaction DC-LT, permettant l'engagement optimal du TCR avec le complexe peptide-CMH. Ce signal, en absence de costimulation, va aboutir à l'anergie. Le deuxième signal est apporté par les molécules de costimulation (CD80, CD86 sur les DC, CD28 sur les lymphocytes) et il est indispensable pour la polarisation des LT naïfs vers les LTh (*helper*) mais aussi vers les LTreg (lymphocyte T régulateur). Le troisième signal est nécessaire à l'induction d'une immunité T efficace, apporté par les LT CD4⁺ via l'expression de CD40L et par les DC via la production des cytokines (Cools et *al.*, 2007) (Figure 9).

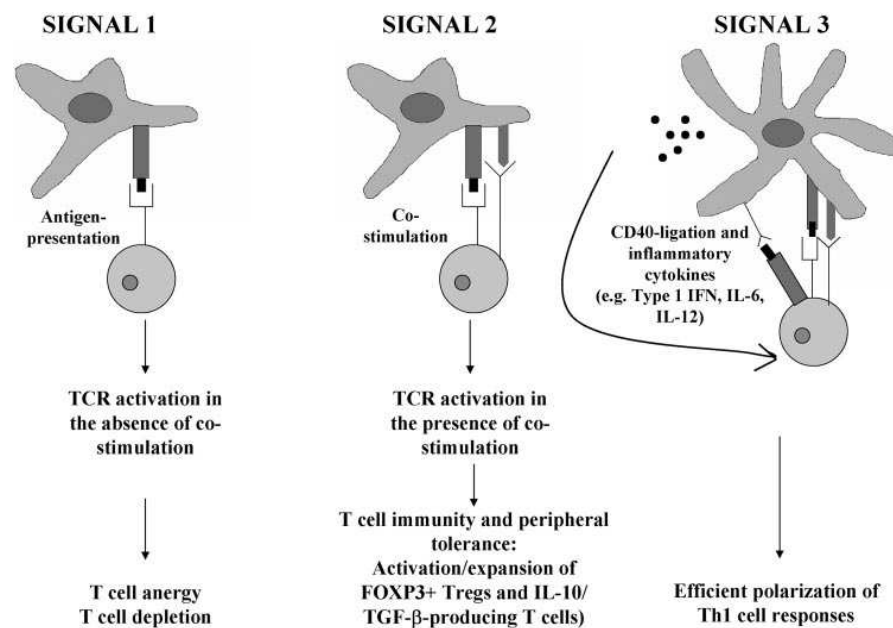


Figure 9 : Les signaux d'activation des lymphocytes (d'après Cools et *al.*, 2007).

L'IL-12 est responsable d'une **polarisation Th1**. Les LT CD4⁺ Th1 sécrètent de l'IFN γ et de l'IL-2 et sont principalement impliqués dans la réaction immunitaire à médiation cellulaire. Ils conduisent à l'activation des LT cytotoxiques et des macrophages qui participent à la réaction immunitaire antitumorale, antivirale et contre les bactéries

intracellulaires. Ils vont soutenir le développement des fonctions effectrices et l'établissement de la mémoire des LT CD8⁺.

L'absence de sécrétion d'IL-12 va dévier la polarisation des LT vers une **orientation Th2** avec production d'IL-4, IL-5, IL-13 et soutien de l'immunité humorale et de la réponse immunitaire antiparasitaire.

La dualité Th1/Th2 a été bouleversée en 2005 avec la description d'une nouvelle population de lymphocytes T CD4⁺, les **lymphocytes Th17**. Ils sont caractérisés par la capacité à produire une cytokine fortement pro-inflammatoire, l'IL-17 (Park et *al.*, 2005). Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la réponse immunitaire anti-infectieuse, mais aussi dans la physiopathologie de plusieurs maladies dysimmunitaires.

En ce qui concerne les **LTreg** CD4⁺CD25⁺, deux grands types ont été identifiés : les Treg naturels, pour lesquels l'expression du facteur de transcription Foxp3 (*forkhead box p3*) apparaît dans le thymus et les Treg induits, pour lesquels Foxp3 est induit en périphérie. Les Treg sécrètent de grandes quantités d'IL-10 et de TGFβ (*Transforming Growth Factor*) et sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie et de la tolérance envers les Ag du soi. Ils interviennent dans le contrôle de la réponse immunitaire en cas d'infection, de cancer ou de transplantation (Sakaguchi et *al.*, 2009).

Il apparaît qu'en fonction du contexte de leur activation, les DC vont déployer des effets différents sur la polarisation des LT, avec des conséquences différentes dans le cancer.

L'orientation Th1 est considérée comme favorable à l'élimination des tumeurs. Ainsi, dans plusieurs modèles expérimentaux, l'orientation Th1, à l'inverse d'une réponse Th2, est corrélée avec une absence de métastases (Pages et *al.*, 2010). Le rôle de la réponse Th2 dans un contexte tumoral est plus controversé : elle pourrait avoir un rôle néfaste par la sécrétion d'IL-10, cytokine immunosuppressive (Aspord et *al.*, 2007) ; en revanche le recrutement des éosinophiles et des macrophages, par la sécrétion d'IL-4, pourrait avoir un rôle favorable pour la destruction des tumeurs (Ellyard et *al.*, 2007). Les DC peuvent aussi induire l'orientation des LT naïfs vers des lymphocytes Treg, qui ont un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Dans un contexte tumoral, leur présence est associée à un pronostic défavorable et considérée comme un des mécanismes de l'échappement tumoral (Liyanage et *al.*, 2002). Les lymphocytes Th17 et les cytokines qu'ils sécrètent peuvent avoir un effet favorable ou au contraire défavorable au processus tumoral. Leur rôle dans la réponse immunitaire antitumorale n'est pas clairement établi (Zou and Restifo, 2010).

L'état d'activation des DC détermine la réponse T qui en découle. En l'absence de signaux danger, peu de DC matures migrent vers les organes lymphoïdes au sein desquels les DC quiescentes maintiennent un état de tolérance périphérique envers les Ag du soi. L'infection microbienne, l'inflammation ou les lésions tissulaires vont activer les DC, la migration de DC matures va augmenter, et la réponse immunitaire spécifique va se mettre en place. Les signaux délivrés par les DC vont conditionner la polarisation des LT et leurs fonctions ultérieures.

10. Induction de la tolérance immunologique par les cellules dendritiques

Les DC exercent la fonction d'inducteurs de l'immunité ou de tolérance immunologique envers les composants du soi (Steinman et *al.*, 2003).

Les DC du thymus (présentatrices d'Ag du soi) induisent la tolérance centrale par la mort apoptotique des LT potentiellement autoréactifs, phénomène appelé **sélection négative** (Brocker et *al.*, 1997).

Des mécanismes périphériques existent également pour éliminer les cellules T autoréactives qui n'ont pas été détruites dans le thymus, dans le but de prévenir le développement de l'auto-immunité (Coquerelle et *al.*, 2010 ;Shortman et *al.*, 2002). Dans un modèle murin, l'élimination des DC a abouti à une absence d'activation efficace des LT naïfs et une réponse immunitaire inadaptée contre l'infection, et aussi au développement de manifestations auto-immunes sévères, avec augmentation des cellules productrices d'IFN γ et d'IL-17, alors que le nombre de LTreg périphériques était normal. Ces observations suggèrent que les DC jouent un rôle important non seulement dans la sélection négative dans le thymus mais aussi dans le maintien de la **tolérance périphérique** (Ohnmacht et *al.*, 2009).

La tolérance aux Ag du soi est probablement induite par des DC quiescentes (en état de maturation incomplète, conservant des propriétés de capture d'Ag, mais n'exprimant que

faiblement les molécules de costimulation) (Albert et *al.*, 2001). En effet, le chargement *in vivo* des DC à l'état basal par des Ag produit une prolifération des LT mais pas de polarisation en sous-types T helper, ni d'activation prolongée des LT, suggérant que les DC non matures pourraient être tolérogènes. En revanche, l'administration des Ag concomitante à un signal de maturation prévient l'induction de la tolérance et aboutit à une activation prolongée des LT (Hawiger et *al.*, 2001).

Effectivement, dans des conditions normales, chaque environnement est contrôlé par un ensemble particulier d'éléments régulateurs pour maintenir l'homéostasie locale, et différents sous-types de DC vont jouer un rôle majeur dans ce contrôle (Figure 10). Par exemple, les sous-types des DC de la lamina propria de l'intestin sont en contact étroit avec la flore intestinale et les Ag apportés par l'alimentation. Les DC vont induire différents types de LTreg ayant un rôle bénéfique de maintien de l'homéostasie locale. En revanche, dans un autre contexte, comme par exemple au sein des tumeurs, l'induction des LTreg par les DC va avoir un effet délétère de suppression de la réponse immunitaire. En cas d'infection chronique, la génération des LTreg peut être induite pour limiter les dégâts tissulaires, avec comme contrepartie la persistance de l'infection (Belkaid et *al.*, 2008).

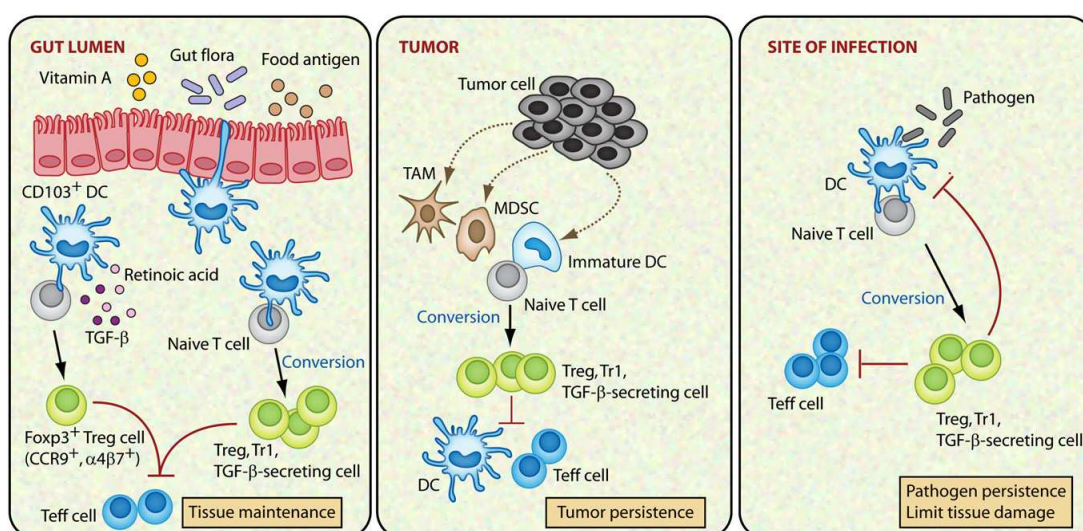


Figure 10 : Conséquences de la production des Treg en fonction de l'environnement local (d'après Belkaid et *al.*, 2008).

Les DC peuvent exercer des fonctions différentes et opposées : elles peuvent induire et l'activation et la différenciation des LT mais aussi maintenir la tolérance périphérique. L'induction de la tolérance est une fonction aussi importante que l'induction d'une réponse T

active, en revanche, en fonction du contexte, elle peut avoir un effet positif ou négatif pour l'organisme. Cette fonction tolérogène peut s'exercer dans certaines conditions de maturation et par des sous-types spécialisés de DC.

11. Fonctions des cellules dendritiques

La Figure 11A représente le schéma du fonctionnement général des DC. Les précurseurs circulants entrent dans les tissus périphériques. Après la rencontre avec l'Ag et l'interaction avec les cellules immunitaires, les DC migrent vers les ganglions lymphatiques, mûrissent et présentent l'Ag induisant une réponse immunitaire T. Les lymphocytes T ainsi activés vont exercer leurs fonctions effectrices et vont assurer la mémoire immunitaire (Banchereau et *al.*, 2000).

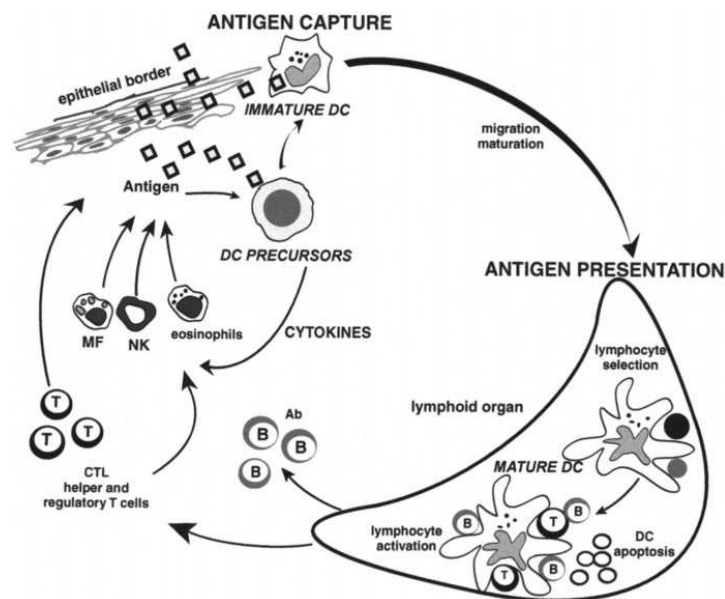


Figure 11A : Fonctionnement général des DC (d'après Banchereau et *al.*, 2000).

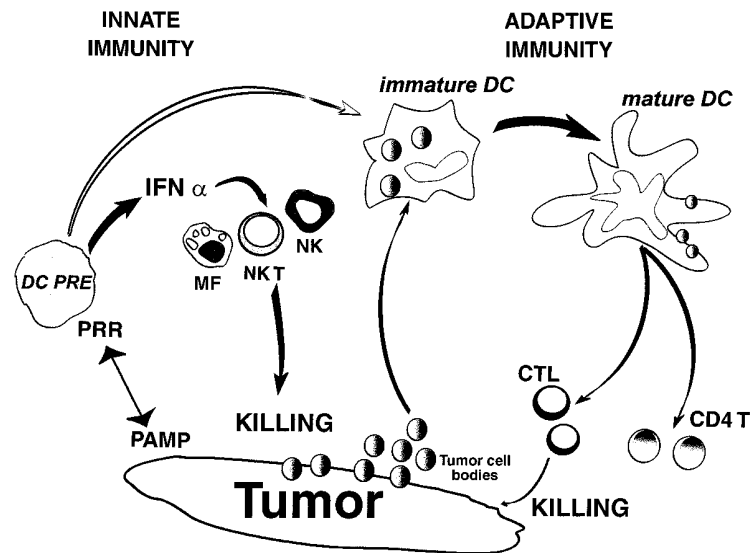


Figure 11B : Rôle des DC dans l'immunité antitumorale (d'après Banchereau et *al.*, 2000).

En 2000, Banchereau avait émis l'hypothèse que les DC jouaient un rôle dans l'immunité antitumorale (Figure 11B) : les précurseurs circulants entrent dans les tissus sous la forme de DC immatures et peuvent rencontrer des cellules tumorales en train de mourir ou des produits des cellules tumorales. L'activation des cellules NK, des macrophages, des cellules NKT va avoir un effet cytotoxique antitumoral. Les DC capturent les Ag tumoraux ainsi libérés, migrent vers les ganglions lymphatiques et présentent les Ag aux lymphocytes, avec comme conséquence la prolifération et la différenciation des lymphocytes en cellules effectrices (Banchereau et *al.*, 2000).

Qu'en est-il en 2010 ?

Chapitre II.

CELLULES DENDRITIQUES ET CANCER

L'existence d'un phénomène d'immunosurveillance antitumorale a été suggérée par l'observation d'une plus grande incidence de cancers chez des patients ayant un déficit immunitaire, congénital ou acquis, et par le fait que des patients cancéreux peuvent développer une réponse immunitaire adaptative antitumorale spécifique. Le fait que des sujets immunocompétents développent un cancer est en revanche en faveur d'un processus immunitaire qui faciliterait la croissance des tumeurs, soit par la sélection des cellules cancéreuses qui sont faiblement reconnues par le système immunitaire, soit par la sélection de cellules tumorales qui ont développé des mécanismes de suppression des fonctions effectrices immunitaires.

Les DC jouent un rôle central dans la réponse immunitaire antitumorale. Elles peuvent présenter des Ag spécifiques des tumeurs aux lymphocytes T spécifiques qui, à leur tour, peuvent réagir contre les cellules tumorales. De plus, les DC peuvent activer les effecteurs de l'immunité innée. En revanche, dans un environnement non favorable, les DC peuvent aussi induire une tolérance envers des Ag spécifiques.

Comprendre le fonctionnement des DC dans ce contexte tumoral nécessite de connaître les interactions entre les cellules tumorales et les cellules du système immunitaire et plus précisément les effets des cellules cancéreuses sur les fonctions des DC.

1. CELLULES DENDRITIQUES ET REPONSE IMMUNITAIRE ANTITUMORALE

1.1. Concept d' « immunoediting »

Les interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses sont complexes. L'immunité adaptative participe autant que l'immunité innée à l'immunosurveillance, avec comme but la protection de l'organisme. Néanmoins, ce processus va influencer l'immunogénicité des tumeurs. Le système immunitaire joue donc un double rôle dans le cancer : non seulement il protège l'organisme contre le développement du cancer, mais il peut également favoriser la croissance tumorale en sélectionnant des variants tumoraux ayant une

immunogénicité réduite. Ce concept appelé « cancer immunoediting » met en avant la dualité fonctionnelle du système immunitaire qui, en détruisant des cellules tumorales sensibles, sélectionne des variants résistants, ayant perdu l'Ag tumoral ou ayant acquis une résistance à la lyse (Dunn et *al.*, 2002). Cette sélection est fortement facilitée par l'instabilité génétique, une caractéristique majeure de la plupart des tumeurs humaines. Le « cancer immunoediting » est classiquement divisé en trois phases : élimination (qui correspond à l'étape d'immunosurveillance), équilibre et échappement (Figure 12) (Dunn et *al.*, 2004 ; Rabinovitch et *al.*, 2007 ; Ueno et *al.*, 2007).

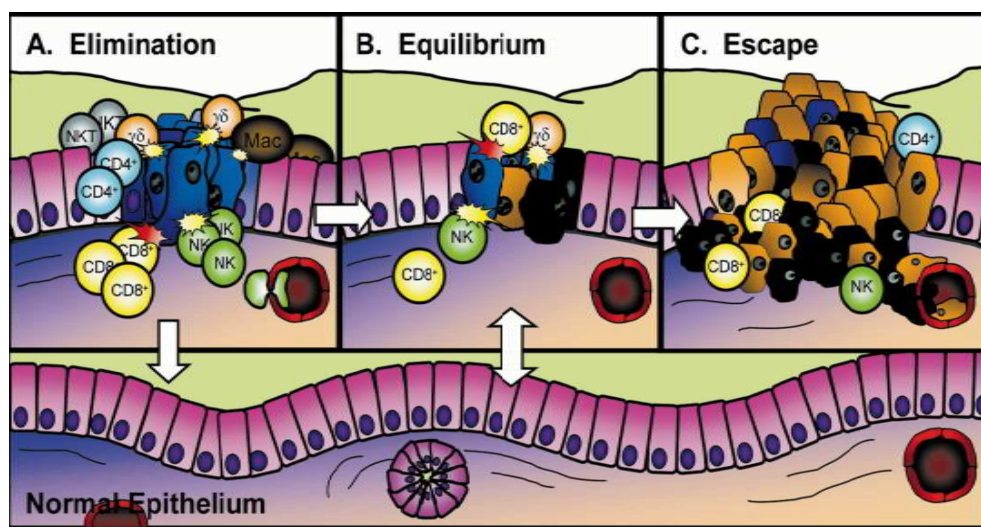


Figure 12 : Les trois phases de « l'immunoediting » : l'élimination, l'équilibre, l'échappement (d'après Dunn et *al.*, 2004).

1.1.1. Phase d'élimination

Cette étape nécessite une réponse intégrée de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Figure 13). Le développement tumoral, par l'induction de lésions tissulaires ou par la libération de molécules pro-inflammatoires, est à l'origine des signaux danger pour les cellules de l'immunité innée (Figure 13A). Les cellules NK, NKT, et les macrophages peuvent reconnaître des molécules exprimées par les cellules tumorales, leur activation aboutissant à la production d'IFN γ et à la lyse des cellules tumorales (Figure 13B). Les cellules tumorales détruites deviennent ainsi une source d'Ag tumoraux disponibles pour

l'immunité adaptative. Les DC immatures recrutées au site tumoral sont activées par l'environnement cytokinique ou par interaction avec les cellules NK (Gerosa et *al.*, 2002). Les DC vont ingérer des débris tumoraux et vont transporter les Ag tumoraux aux ganglions lymphatiques pour induire l'activation des LT CD4⁺ naïfs spécifiques des tumeurs (Figure 13C). Les cellules Th1 vont faciliter le développement des CTL (*Cytotoxic T Lymphocyte*) CD8⁺ spécifiques des tumeurs via la présentation croisée des peptides antigéniques par les molécules de classe I du CMH des DC (Albert et *al.*, 1998 ; Yu et *al.*, 2003). Par la suite, les LT CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de la tumeur arrivent au site tumoral et participent à l'élimination des cellules exprimant l'Ag (Figure 13D). Les LT CD4⁺, par la production d'IL-2, vont maintenir la fonction et la viabilité des LT CD8⁺ cytotoxiques. Les CTL vont reconnaître spécifiquement des cibles sur la tumeur et vont induire leur destruction par un mécanisme cytolytique direct mais aussi indirectement, via la production d'IFN γ qui va participer à l'inhibition du cycle cellulaire, à l'apoptose, à l'angiostase et à l'induction de l'activité cytolytique des macrophages (Bonnotte et *al.*, 2001 ; Dunn et *al.*, 2004 ; Rabinovitch et *al.*, 2007 ; Ueno et *al.*, 2007).

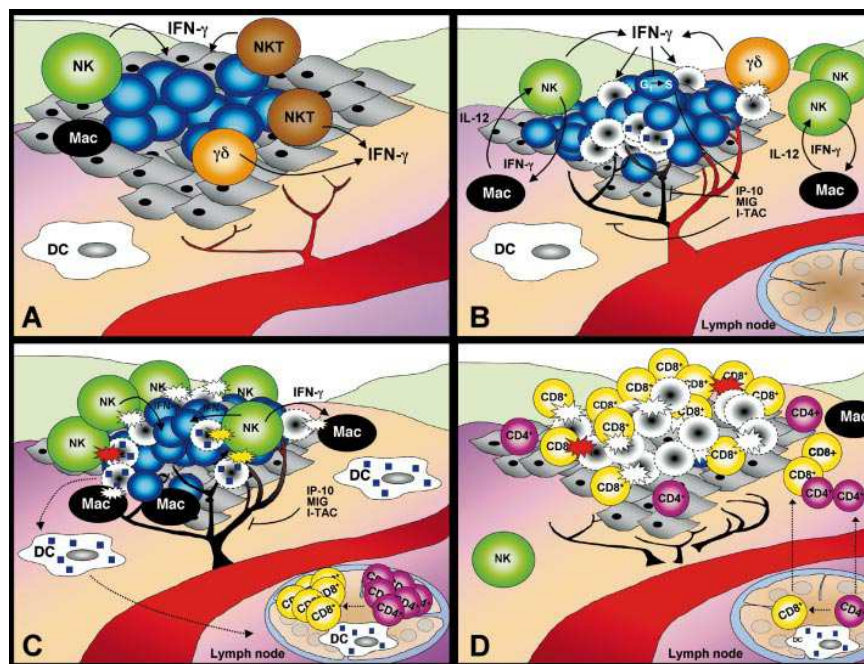


Figure 13 : Participation des cellules de l'immunité innée et adaptative à la phase d'élimination des tumeurs (d'après Dunn et *al.*, 2002).

1.1.2. Phase d'équilibre

Si quelques cellules tumorales deviennent résistantes à cette première étape de destruction, du fait de mutations fortuites, une phase d'équilibre dynamique va s'installer. Les lymphocytes T et l'IFN γ vont exercer une pression de sélection constante, et à la fin de cette phase de nouveaux variants de cellules tumorales vont apparaître. L'instabilité génomique va permettre la naissance d'une nouvelle population de clones tumoraux avec une immunogénicité réduite.

1.1.3. Phase d'échappement

Cette phase comprend une large variété de mécanismes actifs par lesquels les tumeurs échappent à l'action du système immunitaire. La phase d'échappement apparaît quand les modifications génétiques et épigénétiques des tumeurs leur ont conféré une résistance au système immunitaire. Les cellules tumorales vont se développer et la tumeur deviendra détectable cliniquement. Il existe de nombreuses stratégies d'échappement tumoral (Rabinovitch et *al.*, 2007) :

- des stratégies d'immunosuppression, comme la production des cytokines immunosuppressives TGF β ou IL-10, ou l'induction des LTreg (Curiel et *al.*, 2007) ;
- la perte de l'expression des Ag ou des composants du CMH rendant la tumeur « invisible » pour le système immunitaire ;
- l'acquisition d'une insensibilité à l'IFN γ ;
- l'échappement aux mécanismes de mort, par acquisition de défauts dans la voie de signalisation des récepteurs de mort ou par l'expression des signaux anti-apoptotiques.

Les récents progrès dans le développement de modèles sophistiqués de tumeurs chez la souris, l'utilisation d'Ac monoclonaux bloquant certaines fonctions, et l'analyse de larges banques de tumeurs humaines ont permis une meilleure compréhension de l'immunologie des tumeurs avec d'importantes implications dans l'immunothérapie des cancers.

1.2. Cellules dendritiques et immunosurveillance des cancers

Les preuves d'une participation des DC dans l'immunosurveillance des cancers ont été apportées par les modèles de souris transgéniques et la découverte de certains syndromes paranéoplasiques chez l'homme (Chaput et *al.*, 2008) :

- des souris génétiquement déficitaires en IL-12p35 et IL-12p40 (cytokine princeps des DC) ou en molécules CD80/86 (molécules de costimulation exprimées par les DC) présentent une incidence plus élevée de cancers induits (Liu et *al.*, 2004 ; Loser et *al.*, 2005) ;
- chez l'homme, les troubles neurologiques paranéoplasiques observés chez certains patients cancéreux sont le résultat d'une attaque du SNC (système nerveux central) par des LT cytotoxiques induits par la présentation croisée efficace des Ag tumoraux par les DC (Albert et *al.*, 1998).

1.2.1. Les DC infiltrant les tumeurs ont une valeur pronostique

Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre une infiltration par les DC des tumeurs ou des ganglions lymphatiques de drainage et le pronostic clinique. L'infiltration par les DC a été analysée sur des coupes de tissus et corrélée avec l'évolution clinique. L'impact sur le pronostic de cette infiltration par les DC, notamment le nombre, la localisation et l'état de maturation des DC, a été rapporté dans une grande variété de tumeurs solides :

- dans le cancer du sein et le cancer colorectal, les DC immatures résident à l'intérieur de la tumeur, alors que les DC matures forment des agrégats avec les LT en périphérie des tumeurs. Cela suggère que les DC matures à proximité des lymphocytes pourraient avoir un effet favorable et induire l'activation des LT (Bell et *al.*, 1999 ; Suzuki et *al.*, 2002) ;
- la présence de DC langérine⁺ et CD83⁺ au sein de mélanomes est inversement corrélée avec l'index Clark (index pronostique en lien avec le niveau d'infiltration du derme et donc de l'épaisseur de la tumeur) (Simonetti et *al.*, 2007) ;
- dans le cancer du sein, le nombre de DC activées CD83⁺ infiltrant la tumeur est corrélé avec la survie (Iwamoto et *al.*, 2003) ;
- chez le rat, l'injection sous-cutanée des cellules tumorales aboutit au développement des tumeurs, alors que leur injection intradermique (site contenant de nombreuses

DC) n'induit pas le développement des tumeurs et immunisent les animaux contre une nouvelle injection (Bonnotte et *al.*, 2003).

1.2.2. Les DC peuvent être recrutées au sein des tumeurs

La mobilisation et par conséquent l'infiltration des tumeurs par les DC est sous le contrôle de l'environnement cytokinique et plusieurs études plaident en faveur du rôle des chimiokines, des cytokines et des facteurs de croissance comme le GM-CSF dans le recrutement des DC :

- dans le mélanome, des essais de phase I utilisant des cellules tumorales autologues transfectées pour exprimer GM-CSF ont montré une intense infiltration par des DC, des macrophages et des éosinophiles au site de l'injection. Les tumeurs disséminées présentaient un infiltrat de CTL et de plasmocytes associé à un taux élevé d'Ac (anticorps) circulants spécifiques du mélanome. Cela suggère l'implication des DC dans l'initiation de la réponse adaptative, cellulaire et humorale (Soiffer et *al.*, 2003) ;
- l'induction d'une immunité antitumorale a été obtenue également par transfert des gènes codant pour des chimiokines comme CCL20/MIP-3 α dans le but d'augmenter le recrutement des DC au site tumoral. CCL20 est une chimiokine qui se lie au récepteur CCR6 exprimé par les DC immatures. L'expression de CCL20 a induit la régression des tumeurs CT26 via les LT CD8⁺ (Furumoto et *al.*, 2004) ;
- dans le cancer de la thyroïde, le HGF (*hepatocyte growth factor*) stimule les cellules tumorales à sécréter des chimiokines, notamment MIP3 α , augmente l'activité chimiotactique des surnageants de culture des cellules tumorales et favorise ainsi le recrutement des DC (Scarpino et *al.*, 2000).

1.2.3. Les DC peuvent capturer du matériel tumoral

La capture et l'apprêtement des Ag dérivés des cellules tumorales par des DC ont été montrés chez des patients ou des animaux porteurs de tumeurs ayant été traités par radio- ou chimiothérapie :

- dans des modèles de tumeurs expérimentales traitées par chimio- ou radiothérapie, une réponse T protectrice est induite via les DC. Les cellules tumorales en mourant

libèrent la HMGB1, protéine qui induit l'activation des DC via le récepteur TLR-4. Cet effet est annulé en l'absence des DC ou en utilisant un Ac anti-HMGB1. Les patientes ayant un cancer du sein, porteuses d'une allèle rendant le TLR-4 non fonctionnel rechutent plus rapidement après la chimio- ou la radiothérapie que les patients ayant l'allèle normal pour TLR-4 (Apetoh et *al.*, 2007) ;

- les anthracyclines induisent l'expression de la calréticuline à la surface des cellules tumorales en train de mourir, par un mécanisme qui n'est pas encore complètement élucidé mais qui fait intervenir la translocation de la calréticuline intracellulaire à la surface de la cellule, favorisant ainsi la capture des Ag tumoraux par les DC. La calréticuline ainsi exprimée est impliquée dans la phagocytose des cellules tumorales par les DC, car l'utilisation d'un Ac bloquant ou l'invalidation du transcrit de la calréticuline annulent la phagocytose (Obeid et *al.*, 2007).

1.2.4. Le dialogue DC-NK/NKT contribue à la réponse antitumorale

La maturation des DC *in vivo* peut être induite par l'activation des cellules NK ou NKT qui, à leur tour, vont entrer en contact avec les DC et les activer (Piccioli et *al.*, 2002).

- chez la souris, dans plusieurs modèles de tumeurs, l'injection intraveineuse de α -galactosylcéramide aboutit à la présentation croisée du glycolipide par les DC via CD1d et à l'élimination des cellules tumorales exprimant le glycolipide par les cellules NK et NKT (Shimizu et *al.*, 2007) ;
- chez des souris porteuses de tumeurs CMH I négatives, les NK sont impliquées dans la régression tumorale : leur déplétion aboutit à l'inhibition des effets antitumoraux, alors que leur stimulation est suivie d'une éradication complète de la tumeur. Les effets antitumoraux des NK suivaient rigoureusement l'expansion du nombre des DC induite via Flt3L. De plus, *in vitro*, le contact cellulaire DC-NK aboutit à une augmentation de l'activité cytolytique et de la production de l'IFN γ par les cellules NK (Fernandez et *al.*, 1999).

1.2.5. Les DC peuvent induire une réponse T antitumorale

Le concept du rôle des DC dans l'immunosurveillance est soutenu par des expériences de transfert adoptif qui montrent qu'une fois chargées en Ag, les DC sont capables d'induire une réponse T spécifique :

- chez la souris, dans divers modèles de tumeurs, l'injection de DC chargées en peptides spécifiques des tumeurs induit une réponse T spécifique et protectrice. Le traitement de souris porteuses d'un carcinome pulmonaire ou d'un sarcome avec des DC chargées en peptides tumoraux aboutit à une régression tumorale persistante (Mayordomo et *al.*, 1995) ;
- chez l'homme, de plus en plus de preuves de l'induction d'une réponse T spécifique par les DC sont apportées par les essais cliniques dans lesquelles des DC sont utilisées comme vaccins (Steinman et *al.*, 2007). L'évaluation de la réponse T spécifique ainsi induite est rendue possible par le développement des techniques sensibles comme la technique des tétramères CMH/peptides (Altman et *al.*, 1996), la technique ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*) (Czerkinsky et *al.*, 1983) et le marquage intracytoplasmique des cytokines (Jung et *al.*, 1993). Les DC chargées en cellules tumorales tuées peuvent présenter ces Ag aux LT CD8⁺ par l'intermédiaire des molécules de classe I du CMH, la présentation croisée des Ag tumoraux aboutissant à une différenciation des LT CD8⁺ en CTL spécifiques. Ces observations ont été rapportées pour des cellules cancéreuses diverses : mélanome (Berard et *al.*, 2000 ; Cao et *al.*, 2007), cancer de prostate (Nouri-Shirazi et *al.*, 2000), cancer du sein (Neidhardt-Berard et *al.*, 2004 ; Saito et *al.*, 2006).

1.3. Cellules dendritiques et échappement tumoral

Dans le dialogue tumeur-système immunitaire, les DC jouent un rôle décisionnel crucial. Elles peuvent soit stimuler la réponse immunitaire antitumorale efficace permettant le rejet de la tumeur soit au contraire induire une tolérance envers les Ag tumoraux et ainsi favoriser la croissance des tumeurs. Les tumeurs vont employer des mécanismes variés pour échapper à la réponse immunitaire et les DC peuvent être victimes de ces stratégies immunosuppressives. En effet, l'élément central dans l'échappement des tumeurs au système immunitaire est l'altération de la maturation des DC ou de leurs fonctions de présentation de l'Ag. Ces altérations des fonctions des DC vont être responsables d'altérations de la réponse T antitumorale (Rabinovitch et *al.*, 2007 ; Ueno et *al.*, 2007).

1.3.1. Chez les patients atteints de cancer le nombre de cellules dendritiques circulantes est réduit

Plusieurs études ont rapporté l'observation d'un nombre réduit de DC circulantes chez des patients cancéreux :

- dans les stades précoces, les patients cancéreux (cancer du sein, poumon, tête et cou) ont deux fois moins de DC dans le sang que les sujets contrôles, et jusqu'à quatre fois moins dans les stades avancés (Almand et *al.*, 2000) ;
- une étude sur 136 patients porteurs de divers cancers a également observé une diminution significative des DC circulantes et une tendance vers un phénotype immature (Pinzon-Charry et *al.*, 2005) ;
- dans des cancers du sein et de la prostate, le nombre de DC est revenu à la normale après la résection de la tumeur primitive (Almand et *al.*, 2000 ; Della Bella et *al.*, 2003).

1.3.2. Chez les patients atteints de cancer la maturation et les fonctions des cellules dendritiques sont altérées

Dès les années 1990, différentes observations ont suggéré une altération de la capacité des DC à activer correctement la réponse immunitaire en cas de cancer :

- notre équipe avait été la première à montrer une infiltration des tumeurs par des DC immatures non fonctionnelles n'exprimant pas les molécules de costimulation, dans des modèles expérimentaux de cancer de colon chez le rat (Chaux et *al.*, 1997), mais aussi dans des cancers du colon chez l'homme où seulement 10 % des DC isolées des tumeurs expriment CD80 et CD86 (Chaux et *al.*, 1997) ;
- les DC purifiées des 32 patientes ayant un cancer du sein présentent une activité T stimulatrice réduite alors que la stimulation des lymphocytes par un Ac anti-CD3 induit une réponse normale (Gabrilovich et *al.*, 1997) ;
- des données similaires ont été retrouvées dans une étude sur le carcinome basocellulaire : moins de 1 % des DC isolées de la tumeur et seulement 10 % des DC péri-tumorales expriment CD80 et CD86 (Nestle et *al.*, 1997) ;
- les DCp qui infiltrent les tumeurs ont aussi une fonction altérée, produisant peu d'IFN de type I après activation par les TLR (Hartmann et *al.*, 2003) ;
- dans un modèle de tumeur chez le rat, l'infiltration par des DC, immatures, n'aboutit pas à la régression de la tumeur (Bonnotte et *al.*, 2004).

L'altération du nombre, des fonctions et de la maturation des DC peut avoir plusieurs explications :

- cette altération peut résulter d'une absence de signaux danger et/ou de la présence de facteurs immunosupresseurs dérivés des tumeurs (Chaput et *al.*, 2008). En effet, les tumeurs peuvent libérer des facteurs solubles comme IL-6 et M-CSF (*Macrophage Colony-Stimulating Factor*) qui empêche la différenciation des progéniteurs CD34⁺ en DC (Menetrier-Caux et *al.*, 1998). L'environnement tumoral peut produire des molécules immunosuppressives comme l'IL-10 (Gerlini et *al.*, 2004) ou le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Gabrilovich et *al.*, 1996). Ces facteurs, le TGFβ, l'IL-10, le VEGF, la PGE2 (Prostaglandine E2) inhibent la maturation, et cela même en réponse à une activation par CD40L, par IFNγ ou par des ligands des TLR (Bellone et *al.*, 2006) ;
- le défaut de maturation peut s'expliquer par l'activation de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), un facteur de transcription souvent activé dans les cancers et qui inhibe l'expression des chimiokines et cytokines inflammatoires nécessaires à la maturation des DC (Wang et *al.*, 2004) ;
- les lymphocytes Treg recrutés au site tumoral (Seo et *al.*, 2001) exercent un effet inhibiteur sur la différenciation des DC (Larmonier et *al.*, 2007) ;
- des glycoprotéines tumorales comme MUC1 et l'antigène carcinoembryonnaire interagissent avec DC-SIGN et provoquent une rétention des Ag dans les compartiments endosomaux, empêchant un apprêtement et une présentation correcte des Ag tumoraux (Hiltbold et *al.*, 2000) ;
- les tumeurs peuvent produire des ligands LXR (*Liver X Receptor*) qui vont inhiber l'expression de CCR7 et donc empêcher la migration des DC vers les ganglions lymphatiques (Villablanca et *al.*, 2010).

Les facteurs dérivés des tumeurs altèrent la différenciation des DC et favorisent l'accumulation des DC immatures, des LTreg, des DC immunosuppressives et des MDSC (*Myeloid-Derived Suppressor Cells*). Les MDSC constituent une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures, présente chez la majorité des patients cancéreux et qui bloque la réponse antitumorale innée et adaptative. Les MDSC inhibent l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺ et orientent la polarisation des macrophages vers un phénotype M2, favorisant la croissance tumorale. Un des mécanismes par lesquels les cellules myéloïdes immatures inhibent l'activation des LT est représenté par l'hyperproduction de H₂O₂ et nécessite un

contact cellulaire (Kusmartsev et *al.*, 2004). Un autre mécanisme qui interfère avec la fonction des lymphocytes est la séquestration de la cystéine, un acide aminé que les LT ne sont pas capables de synthétiser *de novo* mais qui est très important pour leur activation. Une source de cystéine pour les LT est représentée par les macrophages et les DC. Lors de la présentation des Ag, les APC (*Antigen Presenting Cell*) et les LT se trouvent à proximité et la cystéine libérée est disponible pour les LT. Les MDSC ne peuvent pas synthétiser la cystéine et donc vont appauvrir l'environnement local au détriment des LT qui ne pourront pas s'activer (Ostrand-Rosenberg et *al.*, 2010).

1.3.3. Chez les patients atteints de cancer, le nombre de cellules dendritiques régulatrices et immunosuppressives est augmenté

Les DC infiltrant les tumeurs ont un phénotype immature, avec une sécrétion diminuée des cytokines pro-inflammatoires et une expression faible des molécules de costimulation. Les DC immatures, ou insuffisamment matures, non seulement ne vont pas être capables d'induire une réponse T, mais au contraire elles vont induire une tolérance immunitaire (Steinman et *al.*, 2003). L'environnement tumoral favorise le recrutement des cellules régulatrices, comme les MDSC et les Treg, qui vont contribuer, avec les facteurs solubles dérivés des tumeurs, au dysfonctionnement des DC. Les DC tolérogènes peuvent agir à différents niveaux (Chaput et *al.*, 2008 ; Rutella et *al.*, 2006) (Figure 14).

Les DC vont se retrouver dans un environnement riche en IL-10, cytokine qui peut être produite par les cellules tumorales mais aussi par les lymphocytes infiltrant les tumeurs (Seo et *al.*, 2001). L'exposition des DC immatures *in vitro* à l'IL-10 les transforme en DC tolérogènes. D'une façon dose dépendante, l'IL-10 inhibe l'expression des molécules de costimulation et diminue la capacité des DC à stimuler les LT CD4⁺. Les lymphocytes au contact de ces DC vont produire peu d'IL-2 et d'IFN γ (Steinbrink et *al.*, 1997). Le même auteur rapporte que les DC humaines traitées par l'IL-10 induisent des LT CD4⁺ qui exercent des effets suppresseurs envers les LT spécifiques d'Ag (Steinbrink et *al.*, 2002). En présence d'IL-10, les DC peuvent sécréter elles-mêmes cette cytokine fortement immunosuppressive (Gregori et *al.*, 2010). Des expériences d'inactivation du gène de l'IL-10 des DC ont montré une plus grande capacité des ces DC à sécréter de l'IL-12 et à générer une meilleure réponse CTL envers des épitopes antigéniques de mélanome, MART-1 (Chhabra et *al.*, 2008).

L'IL-10 exerce ses effets immunosuppresseurs par inhibition de la prolifération et de la production des cytokines par les LT (de Waal Malefyt et *al.*, 1991). Elle induit une anergie prolongée de LT spécifiques d'Ag et la différenciation en lymphocytes Tr1 (*type 1 regulatory lymphocyte T*). Les Tr1 se caractérisent par un profil cytokinique unique (production en grande quantité d'IL-10, de TGF β , d'IL-5 et peu d'IL-2 et d'IFN γ) par lequel ils exercent leur effets immunosuppresseurs (Groux et *al.*, 1996).

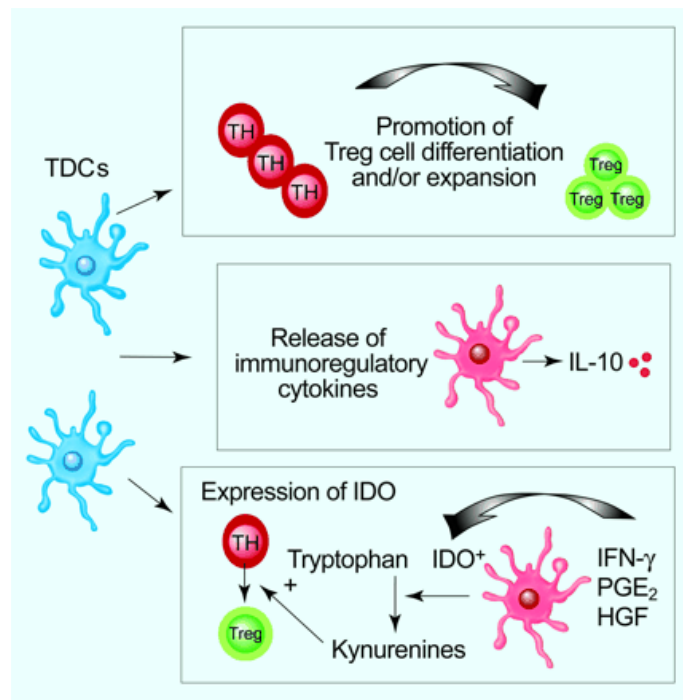


Figure 14 : Les différents mécanismes d'induction de la tolérance (d'après Rutella et *al.*, 2006).

Les DC peuvent participer à la déplétion lymphocytaire via l'appauvrissement du milieu en tryptophane. Une des propriétés tolérogènes des DC est l'expression de l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). Des DC exprimant IDO ont été identifiées dans de nombreuses tumeurs et dans les ganglions de drainage. Dans les cancers surexprimant la PGE₂, on a découvert des DC péri-tumorales exprimant IDO, induites probablement par la présence de PGE₂ (von Bergwelt-Baildon et *al.*, 2006). IDO est une enzyme qui catalyse la conversion du tryptophane en kynurénines, provoquant la déplétion en tryptophane, acide aminé essentiel pour la prolifération des LT (Munn et *al.*, 2005 ; Mellor et *al.*, 2003).

Les DC peuvent induire la différenciation et la prolifération des LT naïfs en LT à activité régulatrice. Chez le rat et la souris, les DC infiltrant les tumeurs, après stimulation par des

facteurs dérivés de la tumeur, expriment le TGF β à leur surface et induisent l'expansion des Treg (Ghiringhelli et *al.*, 2005). En présence de TGF β , les DC immatures semblent être plus aptes à induire des Treg Foxp3⁺ que les DC matures (Knoechel et *al.*, 2005). Les DC déficitaires en molécules CD80 et CD86 induisent une expression de Foxp3 des LT naïfs plus importante que les DC contrôles (Benson et *al.*, 2007). De nombreuses tumeurs expriment un profil altéré des gangliosides, glycosphingolipides contenant de l'acide sialique impliquées dans la prolifération cellulaire (Birkle et *al.*, 2003). L'exposition des DC aux gangliosides aboutit au développement d'une population de DC ayant une expression diminuée de CD86, une sécrétion réduite d'IL-12 et la capacité à induire des LTreg qui, à leur tour, peuvent supprimer les fonctions effectrices des LT (Jales et *al.*, 2010).

En conclusion, les tumeurs sécrètent des molécules immunosuppressives et induisent leur sécrétion par les DC et les macrophages. De cette façon, l'environnement tumoral favorise la différenciation des LTreg et la conversion périphérique des LT CD4⁺CD25⁻ en LT CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Les LTreg vont inhiber ainsi les cellules effectrices antitumorales CD4⁺ Th1 et CD8⁺ CTL (Conroy et *al.*, 2008) (Figure 15).

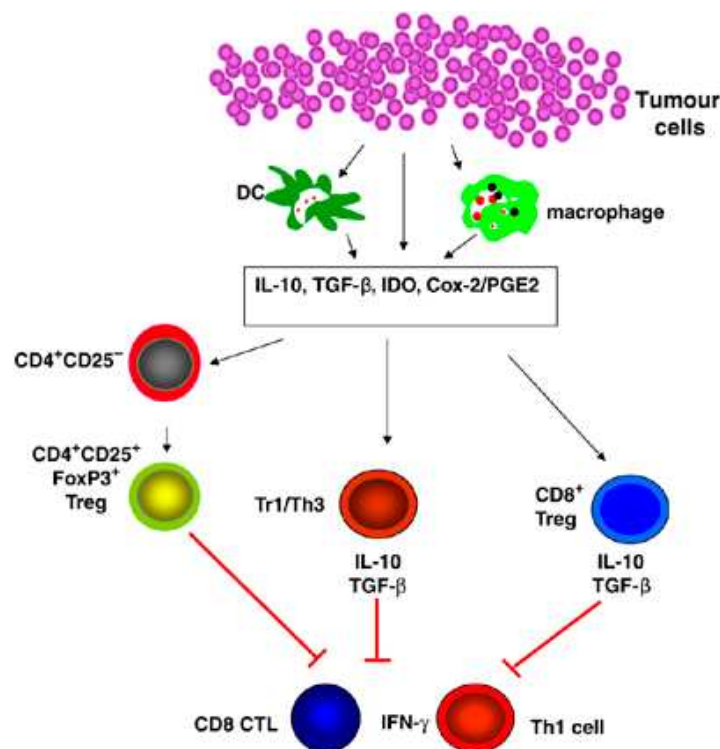


Figure 15 : L'effet immunosuppresseur des tumeurs (d'après Conroy et *al.*, 2008).

Les DC sont des cibles incontournables pour l'immunothérapie des cancers, mais elles restent une arme à double tranchant.

2. CELLULES DENDRITIQUES ET IMMUNOTHERAPIE DES CANCERS

2.1. Argumentaire

Les DC sont des cellules présentatrices d'Ag professionnelles responsables de l'activation des lymphocytes T naïfs. Les DC sont capables d'induire une réponse Th1 et cytotoxique CD8, elles peuvent activer les cellules B naïves et mémoire, elles participent à l'activation des cellules NK et NKT (Banchereau et *al.*, 2005 ; Banchereau et *al.*, 1998). Toutes ces propriétés font des DC des cellules particulièrement intéressantes pour l'immunothérapie. Après avoir résolu le problème de génération des DC *ex vivo*, les DC ont été utilisées dans des stratégies de vaccination contre les tumeurs.

2.2. Vaccins tumoraux à base de cellules dendritiques

Les vaccins contre le cancer ont comme but d'induire une réponse T effectrice spécifique des Ag tumoraux pour réduire la masse tumorale et une réponse T mémoire spécifique de longue durée qui pourrait prévenir les rechutes. Il est intéressant de noter que l'utilisation des vaccins dans le cadre du cancer n'a pas la même finalité que dans le cadre des maladies infectieuses : dans le premier cas, ils ont un but thérapeutique alors que dans l'autre ils ont un but préventif. Dans le cancer, les vaccins sont utilisés pour induire une immunité capable d'intervenir sur un processus tumoral qui est déjà en place (Banchereau et *al.*, 2005 ; Koski et *al.*, 2008).

Plusieurs stratégies ont été adoptées pour utiliser les DC dans l'immunothérapie des cancers : l'injection de préparations antigéniques, le ciblage des DC *in vivo*, ou le transfert adoptif de DC chargées *ex vivo* par des Ag tumoraux (Figure 16).

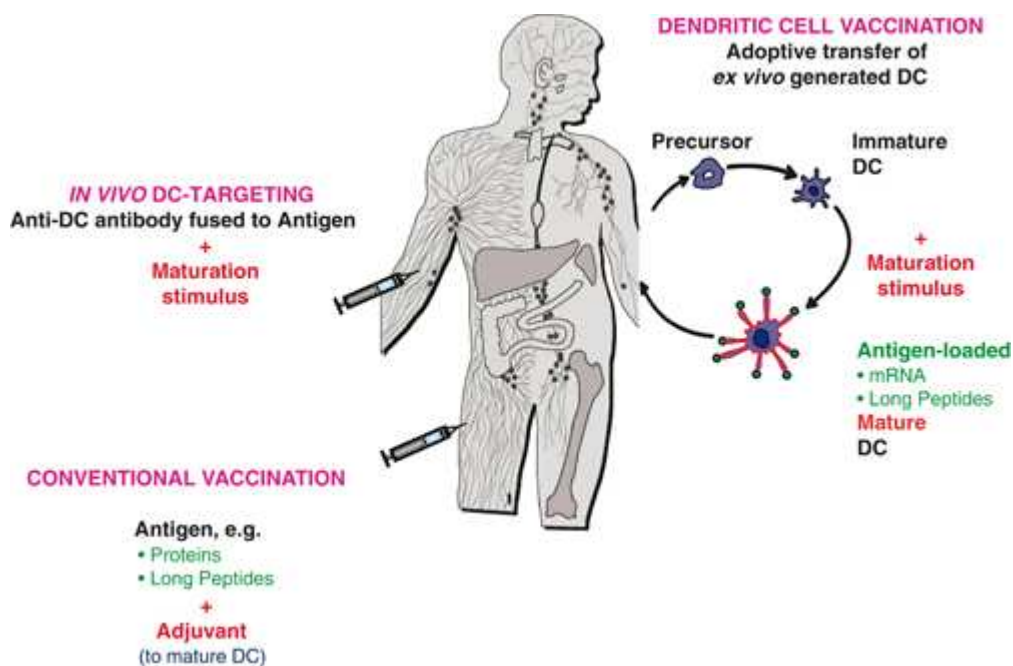


Figure 16 : Les stratégies de vaccination à base de DC (d'après Schuler 2010).

2.3. Génération des cellules dendritiques pour les vaccins antitumoraux

En 1990 a été décrite une méthode qui permet la production en grande quantité de DC humaines à partir de monocytes circulants (Sallusto et *al.*, 1994). Cela a permis l'utilisation des DC dans des essais cliniques d'immunothérapie antitumorale. Par la suite, cette technique de génération des DC a été utilisée dans la majorité des essais cliniques. D'autres types de DC ont été également utilisés mais moins souvent, comme les DC dérivées des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺, les DC myéloïdes circulantes et les DC dérivées des cellules leucémiques (Figure 17).

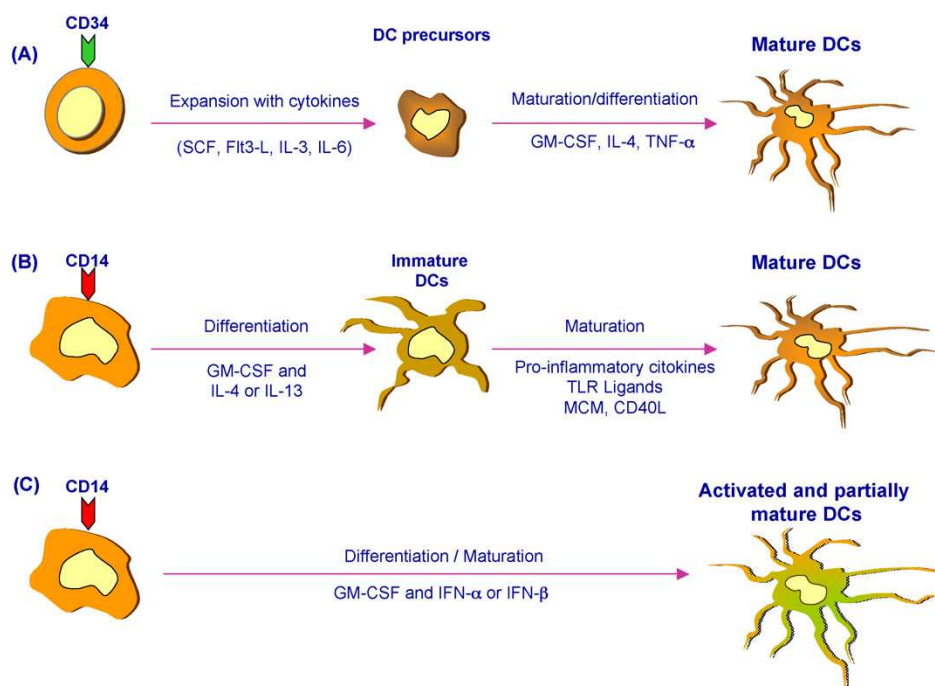


Figure 17 : Les principales méthodes utilisées pour générer des DC dans un but thérapeutique (d'après Ferrantini et *al.*, 2008) : A) cellules CD34⁺ cultivées 5-7 j en présence de cytokines pour l'expansion des précurseurs, puis 5-7 j en présence de diverses cytokines pour générer des DC ; B) monocytes exposés au GM-CSF avec de l'IL-4 ou de l'IL-13, se différenciant en DC immatures dont la maturation peut ensuite être induite par différents moyens ; C) exposition de monocytes aux IFN de type I en présence de GM-CSF induisant leur différenciation en DC partiellement matures.

L'utilisation des DC dans des essais cliniques nécessite la maîtrise de plusieurs étapes :

1. l'isolement des monocytes et leur différenciation en DC ;
2. la maturation des DC ;
3. leur chargement avec les Ag ;
4. l'administration des DC chargées en Ag.

Les monocytes du sang périphérique peuvent être séparés par adhérence sur un support plastique, par tri cellulaire magnétique, ou par élutriation (Erdmann et *al.*, 2007). Ensuite, les monocytes sont différenciés en présence de GM-CSF et d'IL-4, technique qui permet d'obtenir des DC immatures. Les DC ainsi obtenues sont incubées avec des Ag spécifiques des tumeurs et injectées soit après maturation, soit à un stade immature (Simon et *al.*, 2009).

Un point important dans la réussite d'un essai clinique est **l'état de maturation** des DC, car les DC immatures ont une capacité limitée à induire une réponse T et sont plutôt impliquées dans la tolérance (Rosenberg et *al.*, 2004). Des études chez la souris ont montré que l'utilisation de DC immatures préalablement mises en contact avec les Ag cibles aboutit à l'induction d'une tolérance spécifique de ces Ag (Hawiger et *al.*, 2001 ; Kretschmer et *al.*, 2005). De plus, les DC immatures ont peu de capacité de migration vers les ganglions lymphatiques (De Vries et *al.*, 2003).

Depuis 2001, la majorité des essais cliniques utilisent des DC matures, obtenues après 48 h de maturation par différents stimuli. Dans la majorité des essais, un cocktail de cytokines inflammatoires est utilisé pour induire cette maturation (TNF α , IL-1 β , IL-6, PGE2 ou TNF α seul ou d'autres cytokines IFN α , IFN γ , IL-12, CD40L) (Simon et *al.*, 2009). Une autre approche consiste à injecter directement les DC immatures chargées en Ag dans des tissus inflammatoires. Cette approche combine la capacité des DC au stade immature à apprêter correctement l'Ag avec une maturation plus physiologique obtenue au sein des tissus inflammatoires (Nair et *al.*, 2003).

Différentes méthodes ont été testées pour **charger les DC en Ag tumoraux**. La technique la plus utilisée est la charge des DC avec des peptides restreints aux molécules de classe I du CMH, à condition d'avoir auparavant caractérisé les épitopes antigéniques (Singh-Jasuja et *al.*, 2004). D'autres procédés font appel à des protéines recombinantes, à des ARNm (acide ribonucléique messager) transfectés par électroporation, lipofection ou nucléofection, à de l'ADN (acide désoxyribonucléique) transfecté à l'aide de virus recombinants, ou à du matériel tumoral entier (ARN tumoral total, exosomes, lysats tumoraux, cellules tumorales apoptotiques). Cette dernière technique a l'avantage de permettre de présenter un large panel d'Ag tumoraux (Simon et *al.*, 2009). Une autre approche consiste à délivrer les Ag directement aux DC *in vivo* en utilisant des Ac qui vont se fixer sur les récepteurs de surface des DC comme le DEC-205 (Bonifaz et *al.*, 2002 ; Jiang et *al.*, 1995). Chaque technique présente ses avantages mais aucune n'est universellement considérée comme la plus efficace (Schuler et *al.*, 2003 ; van Tendeloo et *al.*, 2001 ; Rosenblatt et *al.*, 2005 ; Dougan M et *al.*, 2009).

Au même titre que la procédure de préparation des DC, la fréquence, la voie d'**injection** ainsi que la quantité de DC administrées varient largement d'un protocole à un autre. Plusieurs voies d'injection ont été testées (intradermique, sous-cutanée, intratumorale,

intranodale). La meilleure efficacité dans l'induction de la réponse immunitaire semble être obtenue par l'utilisation de la voie intradermique ou intranodale (Simon et *al.*, 2009).

La vaccination à base de DC a prouvé son innocuité chez l'homme. **L'évaluation** porte principalement sur deux points :

1. le suivi de la réponse immunitaire induite par les DC (évaluation de la réponse T et de la production des Ac par les LB) ;
2. l'effet thérapeutique sur l'évolution clinique du cancer.

2.4. Cellules dendritiques et essais cliniques

Plus de 200 essais cliniques utilisant les vaccins à base de DC ont été rapportés, avec une grande hétérogénéité en ce qui concerne la production des DC, la charge ou la nature du cancer (Andrews et *al.*, 2008 ; Dougan et *al.*, 2009 ; Schuler et *al.*, 2003 ; Simon et *al.*, 2009).

2.4.1. Les résultats positifs des essais cliniques

Les résultats des essais cliniques menés chez l'homme ont montré l'absence d'effets secondaires (Simon et *al.*, 2009).

Les vaccins à base de DC sont efficaces du point de vue immunogénicité (Schuler et *al.*, 2003 ; Schuler, 2010). Beaucoup d'études ont été réalisées dans le mélanome. Plusieurs Ag tumoraux étant identifiés dans le mélanome, une intense réponse CTL spécifique d'Ag tumoraux a pu être induite chez de nombreux patients (Turner et *al.*, 1999 ; Schuler-Turner et *al.*, 2000).

Dans d'autres études, des résultats positifs ont été également obtenus avec le développement d'une réponse T CD4⁺ et CD8⁺ spécifique de l'Ag tumoral, comme par exemple chez des patients porteurs de cancer de prostate vaccinés avec des DC transfectées avec l'ARNm codant pour le PSA (*Prostate Specific Antigen*), ou chez des patients atteints de cancer du rein vaccinés par des DC transfectées avec l'ARNm tumoral (Heiser et *al.*, 2002 ; Su et *al.*, 2005 ; Su et *al.*, 2003). A l'inverse, même si des réductions des taux de PSA

ont parfois été observées après vaccination, les réponses cliniques ont été très rares dans la grande majorité des essais cliniques (Dannull et *al.*, 2005 ; Heiser et *al.*, 2002).

2.4.2. Les résultats négatifs des essais cliniques

Les vaccins à base de DC sont capables d'induire des réponses T spécifiques, mais peu de réponses cliniques (Janikashvili et *al.*, 2010 ; Paczensy et *al.*, 2003). De plus, les résultats cliniques observés ne sont pas toujours corrélés avec l'induction d'une réponse T spécifique de la tumeur (Figdor et *al.*, 2004 ; Steinman et *al.*, 2007). En outre, la réponse T est en général transitoire et n'aboutit pas à la différenciation en cellules T mémoire à longue durée de vie (Palucka et *al.*, 2007).

Dans une étude clinique de phase III ayant inclus des patients atteints d'un mélanome à un stade avancé, la vaccination par les DC n'a pas apporté de bénéfice par rapport à la chimiothérapie standard, mais les réponses dans les deux cas étaient faibles (chimiothérapie 5,5 % et DC 3,8 %) (Schadendorf et *al.*, 2006).

Une synthèse des résultats des essais cliniques à base de DC chez les patients cancéreux montre que 30 à 50 % des patients ont présenté une réponse immunitaire spécifique vaccinale, mais que seulement 6 à 10 % d'entre eux ont présenté une réponse clinique (Tableau 1) (Giboa et *al.*, 2007 ; <http://www.mmri.mater.org.au>).

Tableau 1: Synthèse des résultats des essais cliniques (d'après Giboa et *al.*, 2007).

Type de cancer	Nombre de patients	Réponse immunitaire (%)	Réponse clinique (%)
Mélanome	573	52,9	10,6
Cancer de prostate	530	56,1	5,8
Cancer du rein	185	45,9	8,6
Cancer colorectal	121	28,2	0

2.4.3. Comment améliorer les essais cliniques

La faible réponse clinique observée lors des différents essais peut être due au fait que les patients inclus sont à un stade avancé de cancer, avec un système immunitaire altéré par l'effet immunosupresseur de la tumeur. Ces patients ont en général aussi reçu plusieurs lignes de chimio- ou radiothérapie, traitements qui par eux-mêmes peuvent avoir un effet délétère sur le système immunitaire (Simon et *al.*, 2009).

Il serait préférable d'évaluer l'efficacité des essais en tenant compte de la durée de survie globale, de la durée de survie sans récurrence et de critères objectifs comme la diminution de la masse tumorale (Dogan et *al.*, 2009).

Quelques résultats cliniques obtenus permettent de suggérer quelques pistes pour améliorer les protocoles d'utilisation des DC. Ainsi, dans un contexte non tumoral, chez des patients ayant une infection chronique par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), la vaccination par les DC a induit une forte réponse dans la majorité des cas, avec une nette réduction de la charge virale (Lu et *al.*, 2004). Des résultats intéressants ont aussi été obtenus chez des patients présentant un mélanome et traités par des DC incubées avec des cellules tumorales irradiées. La vaccination de patients souffrant de mélanomes réfractaires ayant résisté à de multiples lignes de traitements par les DC a permis d'obtenir une période de survie sans récurrence significativement plus longue qu'entre les rechutes traitées de façon conventionnelle (24-58 mois *versus* 14 mois) (Dillman et *al.*, 2006).

Les points communs entre ces deux études (VIH et mélanome) étaient : un chargement des DC avec des Ag endogènes non apprêtés et l'absence d'utilisation de PGE2 dans le cocktail de maturation des DC. En effet il a été rapporté que la PGE2 induit une plus grande capacité de migration des DC, mais une plus faible sécrétion d'IL-12 et une plus faible sensibilité des DC pour l'activation via CD40 (Ferrantini et *al.*, 2008 ; Giboia et *al.*, 2007).

En conclusion, la production de vaccins à base de DC fait appel à de multiples techniques de production, d'expansion, de charge en Ag et d'activation des DC, ainsi que diverses sources d'Ag. Actuellement les résultats cliniques sont décevants et les protocoles de vaccination sont à améliorer. Cependant les DC restent une arme très prometteuse pour lutter contre les tumeurs. En effet, les DC pourraient induire une réponse CTL et Thelper efficace et durable, mais aussi, à la lumière de publications relativement récentes, directement détruire la tumeur grâce à des propriétés cytotoxiques.

Chapitre III.

LES CELLULES DENDRITIQUES CYTOTOXIQUES

Les effecteurs classiques cytotoxiques les plus étudiés sont les cellules NK, les lymphocytes CD8 cytotoxiques et les macrophages. Ils jouent un rôle important dans l'élimination des cellules infectées par des virus ou des cellules tumorales. L'élimination directe des cellules tumorales a été attribuée aux cellules tueuses spécialisées, les CTL, NKT, NK ou macrophages.

Dans le contexte de la réponse immunitaire antitumorale, les DC ont principalement été étudiées pour leur rôle de cellules présentatrices d'Ag professionnelles. Effectivement, les DC jouent un rôle central dans l'initiation de la réponse antitumorale spécifique en présentant les Ag aux LT CD4⁺ ou CD8⁺ naïfs. Par le panel de cytokines qu'elles sécrètent, les DC régulent le type, l'intensité et la durée de la réponse immunitaire T. De plus, elles peuvent participer à l'activation d'autres cellules cytotoxiques, cellules NK et NKT et macrophages ainsi qu'à la réponse immunitaire humorale (Balista et *al.*, 2009 ; Kalinski et *al.*, 2005 ; Walzer et *al.*, 2005).

Cependant, les DC possèdent d'autres propriétés qui rendent prometteuse leur utilisation en immunothérapie antitumorale. En effet, en plus de leur capacité à induire et à réguler la réponse adaptative antitumorale, les DC possèdent des capacités cytotoxiques directes envers les cellules tumorales, comme l'ont montré plusieurs études chez l'animal et chez l'homme (Chan et *al.*, 2008 ; Chauvin et *al.*, 2008 ; Ullrich et *al.*, 2008 ; Wesa et *al.*, 2008). Cette activité antitumorale directe facilite la capture des Ag tumoraux par les DC et leur présentation ultérieure. Ce double rôle de cellules tueuses et de cellules présentatrices d'Ag peut avoir donc des implications dans l'immunothérapie des cancers.

Les résultats des études rapportant un effet cytotoxique des DC chez l'homme ou chez le rongeur sont hétérogènes et parfois même controversés. Nous avons détaillé et discuté ces résultats dans une revue récente (Larmonier et *al.*, 2010). Dans ce chapitre, je présenterai une synthèse des principales études sur les cellules dendritiques cytotoxiques en axant le sujet sur les nombreuses questions soulevées encore à cet égard, notamment chez l'homme.

1. Cellules dendritiques cytotoxiques chez le rat

La première démonstration des propriétés cytotoxiques des DC envers les cellules tumorales a été réalisée chez le rat. Les DC spléniques après une maturation spontanée *in vitro*, présentaient spontanément une cytotoxicité dépendante du calcium contre la lignée tumorale YAC-1 (Josien et *al.*, 1997). Par la suite, un sous-type de DC immatures CD11b⁺ isolé à partir des organes lymphoïdes de rats a été décrit comme DC cytotoxiques. En effet, ces DC ont été capables d'induire l'apoptose de différentes lignées tumorales cellulaires de façon spontanée, sans activation préalable, par un mécanisme indépendant du système perforine-granzyme ou des récepteurs de mort. Ces résultats suggèrent que les DC utilisent des mécanismes de cytotoxicité différents en fonction de leur état de maturation. Après avoir tué les cellules tumorales, ces DC étaient capables de phagocytter les fragments tués, suggérant un potentiel d'activation de la réponse adaptative (Trinité et *al.*, 2000 ; Trinité et *al.*, 2005).

D'autres mécanismes cytotoxiques, comme la voie NKR-P2, ont été rapportés dans l'activation des DC cytotoxiques de rats. Le traitement des DC par un Ac agoniste anti-NKR-P2 augmente le potentiel cytotoxique des DC (Alli et *al.*, 2004), et l'activation des DC par cette voie aboutit à l'expression des molécules de costimulation et à la production de TNF α et de monoxyde d'azote (NO) (Srivastava et *al.*, 2007).

Notre équipe a rapporté que l'activité cytotoxique des DC dérivées de la culture de leurs progéniteurs contenus dans la moelle osseuse (*BDCM : Bone Marrow-derived Dendritic Cells*) est significativement augmentée par l'IFN γ et les LPS. Le mécanisme cytotoxique implique le NO. De plus, nous avons montré que ces DC cytotoxiques peuvent jouer un rôle *in vivo* et participer à la régression tumorale (Nicolas et *al.*, 2007).

Des preuves *in vivo* d'une activité antitumorale ont été également rapportées dans un modèle d'ostéosarcome. Chauvin et *al.* ont obtenu une régression de la tumeur après avoir injecté chez ces rats porteurs de tumeur des DC ayant préalablement tué et phagocyté *in vitro* les cellules tumorales. L'effet sur la tumeur était annulé si les rats avaient subi un traitement éliminant les LT CD8⁺, suggérant que les DC cytotoxiques seraient capables d'effectuer une présentation croisée des Ag tumoraux (Chauvin et *al.*, 2008).

2. Cellules dendritiques cytotoxiques chez la souris

Chez la souris, la première étude rapportant une activité cytotoxique des DC a été publiée en 1996 par Suss et *al.* Une population de DC spléniques $CD11c^{high}CD8\alpha^{+}$ a été décrite comme capable d'induire la mort par apoptose des lymphocytes T via un mécanisme Fas-FasL (Suss et *al.*, 1996). Un mécanisme identique a été rapporté pour les cellules de Langerhans murines rendues cytotoxiques après activation par le CD40L (Shibaki et *al.*, 2001).

Chez les souris infectées par *Listeria monocytogenes* une population de DC spléniques $CD11c^{int}CD11b^{int}$ cytotoxique a aussi été décrite. Les mécanismes de cytotoxicité impliquent principalement la sécrétion de $TNF\alpha$ et la libération de NO. Cette population participe au contrôle de l'infection, mais n'est pas capable d'activer des LT naïfs (Serbina et *al.*, 2003).

Par la suite, plusieurs études ont rapporté la présence chez la souris d'une population hybride NK-DC (*Natural Killer-Dendritic Cell*) ayant des propriétés cytotoxiques tumoricides et des propriétés d'APC aboutissant à l'induction d'une réponse T efficace. Cette population de cellules produit de grandes quantités d' $IFN\gamma$ après contact avec les cellules tumorales ou après activation par CpG, IL-4, IL-12 ou IL-18 (Chaudhry et *al.*, 2006 ; Pillarisetty et *al.*, 2005). Cette population a été isolée de la rate, du foie, des ganglions et du thymus, et présente un phénotype intermédiaire entre DC et NK : $CD11c^{+}NK1.1^{+}CMH\ II^{+}Ly49^{+}CD49b^{+}CD69^{+}$. Ces DC sont capables d'exercer une activité cytotoxique envers des cellules tumorales après activation, et ensuite de présenter les Ag tumoraux aux lymphocytes T naïfs (Chaudhry et *al.*, 2006 ; Pillarisetty et *al.*, 2005). L'existence d'une telle population cellulaire ayant des fonctions des NK et des DC a été mise en doute car les marqueurs phénotypiques utilisés (CD11c et NK1.1) ne permettent pas de distinguer sans aucune ambiguïté les deux populations et qu'une contamination par les NK ne peut pas être complètement exclue (Spits et *al.*, 2007).

Un sous-groupe de NKDC nommé IKDC (*Interferon producing Killer Dendritic Cells*) a fait l'objet plus récemment de nombreuses études (Caminschi et *al.*, 2007 ; Chan et *al.*, 2006 ; Shortman et *al.*, 2006 ; Taieb et *al.*, 2006 ; Zitvogel 2008). Les IKDC ont été définies phénotypiquement comme $CD11c^{+}B220^{+}NK1.1^{+}CD3^{-}CD19^{-}Gr1^{-}Ly6C^{-}$. A l'état non activé, les IKDC n'expriment pas de molécules de costimulation ni de molécules de classe II du CMH. Après activation par des agonistes des TLR ou des cytokines, ou après contact avec des cellules tumorales ou des cellules infectées par des virus, les IKDC surexpriment CD40,

CD86 et les molécules de classe II du CMH II. Cet effet n'est pas observé après contact avec les cellules normales (Chan et *al.*, 2006. ; Taieb et *al.*, 2006). L'activité cytotoxique semble être en lien avec la surexpression de NKG2D et de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). Leur activité cytotoxique semble transitoire et la perte de cette activité coïncide avec l'expression des molécules du CMH et de costimulation. De ce fait, elles ont été considérées comme jouant un rôle majeur dans l'immunosurveillance des cancers (Bonmort et *al.*, 2008 ; Chan et *al.*, 2008 ; Himoudi et *al.*, 2009 ; Taieb et *al.*, 2006). Néanmoins, plusieurs publications mettent en doute l'existence d'une telle population hybride et leurs capacités de présentation d'antigène, et suggèrent que ces cellules n'appartiennent pas à la lignée des DC mais à celle des NK (Blasius et *al.*, 2007 ; Caminschi et *al.*, 2007 ; Vosshenrich et *al.*, 2007).

Outre les études sur des DC murines fraîchement isolées, des études ont été menées sur les DC différenciées *in vitro* à partir de leurs progéniteurs contenus dans la moelle osseuse (BDMC). Des activités cytotoxiques ont été rapportées, soit spontanées (Huang et *al.*, 2005) soit après stimulation par les LPS (Yu et *al.*, 2002). Les résultats concernant le mécanisme de l'activité tumoricide de ces BDMC sont hétérogènes :

- certains auteurs rapportent l'implication des récepteurs de mort Fas-L, TRAIL et TNF (Huang et *al.*, 2005 ; Lu et *al.*, 1997 ; Yu et *al.*, 2002) ;
- pour d'autres auteurs, l'apoptose des cellules tumorales n'implique pas les récepteurs de mort mais le NO (Shimamura et *al.*, 2002) ;
- récemment, dans une étude menée au sein de notre équipe de recherche, nous avons pu mettre en évidence un nouveau mécanisme qui fait intervenir la production des peroxynitrites (Fraszczak et *al.*, 2010).

3. Cellules dendritiques cytotoxiques chez l'homme

Les résultats des études sur les DC cytotoxiques chez l'homme sont très hétérogènes ; en effet les sous-types de DC impliquées, les mécanismes de cytotoxicité et leur mode d'induction sont très variables selon les études.

3.1. Activité cytotoxique des DC humaines isolées du sang périphérique

Certaines équipes ont étudié les DC fraîchement isolées du sang périphérique et les résultats plaident en faveur d'un potentiel cytotoxique de ces cellules, la plupart du temps après une activation exogène. Classiquement, les DC chez l'homme sont séparées en $CD11c^+HLADR^{+high}$, les DC myéloïdes, et en $CD123^+HLADR^{+int}$, les DC plasmacytoïdes. Des propriétés cytotoxiques ont été rapportées pour les deux groupes:

- après exposition aux virus et activation via TLR-7 ou TLR-9, les DC plasmacytoïdes acquièrent des propriétés cytotoxiques dépendantes de TRAIL (Chaperot et *al.*, 2006 ; Hardy et *al.*, 2007) ;
- après activation par $IFN\alpha$ ou $IFN\gamma$, des DC $CD11c^+$ du sang périphérique peuvent tuer des cellules tumorales secondairement à l'expression de TRAIL, (Fanger et *al.*, 1999) ;
- d'autres études ont rapporté un effet cytotoxique envers une grande variété de cellules tumorales, mais pas envers les cellules normales. Il s'agissait de DC immatures $HLADR^+CD4^+Lin^-$, isolées du sang périphérique, qui induisent l'apoptose par l'intermédiaire de $TNF\alpha$, de FasL ou de la lymphotoxine $\alpha1\beta2$ (Janjic et *al.*, 2002 ; Lu et *al.*, 2002) ;
- Manna et *al.* rapportent une activité cytotoxique des DC envers des cellules tumorales mammaires, en présence de LPS, IL-15 ou $IFN\gamma$, accompagnée d'une forte production de $TNF\alpha$ (Manna et *al.*, 2002).

Les résultats de ces études soulignent le potentiel des DC naturellement présentes dans l'organisme à développer une activité cytotoxique, généralement augmentée après une activation exogène par des composants bactériens ou viraux.

3.2. Activité cytotoxique des DC humaines générées ex vivo

La plupart des études sur les DC cytotoxiques chez l'homme ont utilisé des DC générées *ex vivo*, principalement à partir des monocytes du sang périphérique du fait de la très faible quantité des DC circulantes et grâce au développement des techniques qui ont permis la production en grande quantité de DC à partir des monocytes.

Plusieurs études ont rapporté l'activité tumoricide *in vitro* des DC obtenues à partir des monocytes sanguins vis-à-vis d'une grande variété de cellules tumorales (Ayres et *al.*, 2004 ; Chapoval et *al.*, 2000; Janjic et *al.*, 2002 ; Joo et *al.*, 2002 ; Liu et *al.*, 2001 ; Lu et *al.*, 2002 ; Vanderheyde et *al.*, 2001 ; Vanderheyde et *al.*, 2004 ; Vidalain et *al.*, 2001).

Néanmoins plusieurs questions restent sans réponse consensuelle.

L'état de maturation des DC intervient-il dans leurs propriétés cytotoxiques ?

Certaines auteurs rapportent une activité tumoricide des DC immatures envers des cellules tumorales, qu'il s'agisse de tumeurs hématopoïétiques ou de tumeur solides (Vanderheyde et *al.*, 2001 ; Janjic et *al.*, 2002 ; Vanderheyde et *al.*, 2004). D'autres auteurs retrouvent une nette augmentation de l'effet cytotoxique des DC matures (Chapoval et *al.*, 2000 ; Joo et *al.*, 2002).

Les propriétés cytotoxiques des DC sont-elles induites ou potentialisées par un agent exogène ?

Plusieurs activateurs ont été testés, seuls ou en association :

- des DC en présence soit de CD40L, soit de LPS ou les deux étaient capables d'inhiber la croissance tumorale de lignées de cancer mammaire (Joo et *al.*, 2002) ;
- le traitement par IFN α , IFN β ou IFN γ de DC cytotatiques et cytotoxiques n'a pas augmenté leur activité cytotoxique (néanmoins les LPS ont favorisé leurs effets cytotatiques) (Vanderheyde et *al.*, 2001 ; Vanderheyde et *al.*, 2004) ;
- pour d'autres auteurs, le traitement des DC par les LPS ou par l'IFN γ a entraîné une augmentation de l'effet inhibiteur sur la croissance tumorale, mais cet effet n'a pas été retrouvé avec le TNF α ou CD40L (Chapoval et *al.*, 2000) ;
- une autre étude rapporte une augmentation du pouvoir cytotoxique des DC après activation par de l'IFN β (Liu et *al.*, 2001) ;
- un agoniste de TLR-3 (poly-IC) a entraîné une maturation des DC qui ont acquis des propriétés de cytotoxicité envers des cellules tumorales (Vidalain et *al.*, 2001) ;
- des DC activées par OK432, une préparation de *Streptococcus pyogenes* inactivés, deviennent fortement cytotoxiques contre de nombreuses lignées tumorales. Le mécanisme dépend de l'interaction CD40-CD40L (Hill et *al.*, 2008).

Quel est le mécanisme par lequel les DC exercent leur cytotoxicité ?

Existe-t'il un mécanisme unique de cytotoxicité, ou bien les DC disposent-elles de plusieurs mécanismes cytotoxiques en fonction de leur activation, de la nature du signal ou de l'environnement dans lequel elles se trouvent ? Des mécanismes très variés ont en effet été rapportés.

La nécessité d'un contact entre les cellules tumorales et les DC est soulignée par certains auteurs (Chapoval et *al.*, 2000) alors que d'autres montrent un rôle indispensable des médiateurs solubles en plus du contact cellulaire (Janjic et *al.*, 2002).

Les mécanismes décrits impliquent parfois les récepteurs de mort (TNF α , Fas, TRAIL) dans l'induction de la mort des cellules tumorales (Griffith et *al.*, 1999 ; Liu et *al.*, 2001 ; Lu et *al.*, 2002 ; Vidalain et *al.*, 2001) mais d'autres études rapportent, au contraire, un mécanisme de cytotoxicité indépendant des récepteurs de mort (Ayres et *al.*, 2004 ; Vanderheyde et *al.*, 2001).

Vidalain et *al.* décrit deux mécanismes différents en fonction du mode d'activation des DC : l'ARN double brin induirait une mort TRAIL alors que l'activation via CD40L ferait intervenir le TNF α et des mécanismes non identifiés (Vidalain et *al.*, 2001).

De nombreux mécanismes cytotoxiques des DC générées à partir des monocytes sanguins ont été rapportés et la disparité de ces résultats reste sans explication à ce jour.

D'autres études ont été menées sur des **DC différenciées à partir de cellules du sang du cordon, de cellules CD34⁺ ou d'autres sources.**

Des effets cytotoxiques ont été rapportés pour les DC générées à partir de cellules CD34⁺ après stimulation par IFN β . Le mécanisme implique l'expression de TRAIL (Liu et *al.*, 2001).

Les DC générées à partir de monocytes de sang de cordon ombilical acquièrent des capacités cytotoxiques après stimulation par les LPS ou l'IFN γ . Elles peuvent tuer des cellules tumorales d'origine hématologique de façon spécifique. En effet, après stimulation par les LPS, les DC tuent les cellules Daudi de lymphome de Burkitt, alors que les cellules HL60 de

leucémie promyélocytaire vont être sensibles aux DC après stimulation par IFN γ . Cette cytotoxicité n'est pas observée envers des progéniteurs hématopoïétiques (Shi et *al.*, 2005).

De façon intéressante, des DC obtenues à partir des monocytes de liquides d'ascite provenant de patientes atteintes d'un cancer ovarien ont été identifiées comme cellules tueuses envers des cellules de cancer d'ovaire autologues ou allogéniques. Ces DC présentaient une activité cytotoxique également envers diverses lignées tumorales. Le mécanisme impliqué semble être dépendant de la voie Fas/FasL comme le montre la quantité importante de FasL intracellulaire et l'abolition de l'effet cytotoxique par un Ac bloquant la voie Fas (Yang et *al.*, 2001).

L'activité cytotoxique est-elle spécifique des cellules tumorales ?

Certaines études indiquent une spécificité de l'effet cytotoxique des DC qui tueraient uniquement les cellules tumorales en étant capables d'épargner les cellules normales. Bien que cela ait été rapporté pour des DC dérivées de monocytes circulants (Janjic et *al.*, 2002) ou du sang du cordon ombilical (Shi et *al.*, 2005.96.127), et pour des cellules mononucléées du sang périphérique (Hubert et *al.*, 2001), le mécanisme de cette spécificité n'a pas été élucidé.

Les DC cytotoxiques sont-elles capables d'induire une réponse T spécifique ?

Pour l'instant il n'y a pas de réponse claire à cette question.

Certains auteurs ont montré que les DC peuvent capturer des cellules tumorales par phagocytose, induire par la suite une prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ autologues et une activité CTL spécifique d'Ag. Ces résultats prouvent que des cellules tumorales allogéniques tuées peuvent être capturées par des DC pour induire une réponse T spécifique de la tumeur. Néanmoins, dans cette étude, les cellules tumorales avaient été tuées auparavant et les DC n'exerçaient pas de fonctions cytotoxiques (Nouri-Shirazi et *al.*, 2000).

Dans l'étude utilisant des DC dérivées des monocytes de liquides d'ascite, les auteurs rapportent une activité cytotoxique de ces DC envers des cellules de cancer de l'ovaire, autologues ou allogéniques, et mettent en évidence des fragments de cellules tumorales apoptotiques dans le cytoplasme des DC. Des lymphocytes cytotoxiques spécifiques des

tumeurs ont été obtenus par des stimulations répétées avec des DC cultivées avec des cellules tumorales autologues apoptotiques (Yang et *al.*, 2001).

Les DC cytotoxiques in vivo

Un traitement par imiquimod, un agoniste de TLR-7/8, en application locale à des patients porteurs de carcinome basocellulaire a été suivi d'une régression tumorale au niveau clinique, et localement d'un recrutement de DC au site tumoral avec augmentation de la mort des cellules tumorales. L'analyse immunohistologique a révélé que l'infiltrat était constitué autant de DCp, infiltrant la tumeur et exprimant TRAIL, que de DCm, situées en périphérie de la tumeur et exprimant perforines et granzymes, associées aussi à des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, des NK, et des neutrophiles. Après activation par les ligands des TLR-7/8, les DCm, isolées du sang périphérique, exprimaient perforines et granzymes et tuaient les cellules leucémiques K562, alors que les DCp exprimaient TRAIL, ce qui leur permettait d'exercer une activité cytolytique sur des cellules Jurkat. Même si l'extrapolation de ces résultats *in vitro* à ce qui se passe réellement *in vivo* est difficile, une corrélation a néanmoins été trouvée entre la régression tumorale et la présence de DC cytotoxiques (Sary et *al.*, 2007).

En conclusion, comme pour les études chez les rongeurs, les résultats des travaux étudiant le mécanisme de cytotoxicité, l'agent inducteur ou les cibles des DC cytotoxiques humaines sont très hétérogènes. Une synthèse de ces résultats est présentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les DC cytotoxiques (d'après Larmonier et *al.*, 2010).

Type de DC	Mécanisme	Induction	Cible	Référence
DCm CD11c sang	TRAIL	IFN α , IFN γ	Cellules tumorales	Fanger et <i>al.</i> , 1999
	TNF α	LPS, IFN γ IL-15	Cellules tumorales	Manna et <i>al.</i> , 2002
	Perforine/granzyme	TLR-7/8	K562	Sary et <i>al.</i> , 2007
DCm DC8+ sang	TNF α	IFN γ	Cellules tumorales	Schmitz et <i>al.</i> , 2005
CD4+HLADR +Lin- sang	TNF α , TRAIL, FasL, lymphotoxines	spontané	Cellules tumorales, cellules endothéliales	Janjic et <i>al.</i> , 2002 Lu et <i>al.</i> , 2002
DCp sang	TRAIL	TLR-7/8	Jurkat	Sary et <i>al.</i> , 2007
		Influenza, CpG	A549	Chaperot et <i>al.</i> , 2005
		HIV, IFN, Imiquimod	Cellules T	Hardy et <i>al.</i> , 2007
CD34+	TRAIL	IFN β	Cellules tumorales	Liu et <i>al.</i> , 2001
Monocyte DC	TRAIL	Virus de la rougeole	MDA231	Vidalain et <i>al.</i> , 2001
		CD40L	Cellules tumorales	Vidalain et <i>al.</i> , 2001
		IFN α , IFN γ	Cellules tumorales	Griffith <i>al.</i> , 1999
		LPS, IFN γ	Cellules tumorales	Shi <i>al.</i> , 2005
		IFN β	Cellules tumorales	Liu <i>al.</i> , 2001
		ARNdb	MDA231	Vidalain <i>al.</i> , 2001
		spontanée	Cellules tumorales	Ayres <i>al.</i> , 2004
	TNF α , TRAIL, FasL, lymphotoxines	spontanée	Cellules tumorales	Lu <i>al.</i> , 2002
	TNF α	LPS, IFN γ	Cellules tumorales	Manna <i>al.</i> , 2002
		CD40L	MDA231	Vidalain <i>al.</i> , 2001

Malgré toutes ces disparités, notamment en ce qui concerne les agents inducteurs et les mécanismes cytotoxiques, la majorité de ces études confirment le potentiel cytotoxique des DC envers les cellules tumorales.

Ce potentiel cytotoxique pourrait permettre l'amélioration des stratégies d'immunothérapie des cancers par plusieurs aspects :

- les DC cytotoxiques peuvent contribuer directement à l'élimination des cellules tumorales. Les DC cytotoxiques pourraient utiliser un mécanisme cytotoxique supplémentaire contre les cellules tumorales qui ont déjà développé des stratégies de résistance à la mort induite par les NK ou CTL. La diversification des mécanismes cytotoxiques pourrait diminuer la résistance des cellules cancéreuses ;

- les DC cytotoxiques, après avoir tué les cellules tumorales, pourraient se charger directement et rapidement en Ag tumoraux, avant l'élimination de ce matériel tumoral par les neutrophiles ou les macrophages, et ensuite présenter les Ag tumoraux aux lymphocytes T.

Les DC cytotoxiques sont des acteurs multifonctions qui interviennent à différents niveaux dans la lutte contre le cancer (Figure 18).

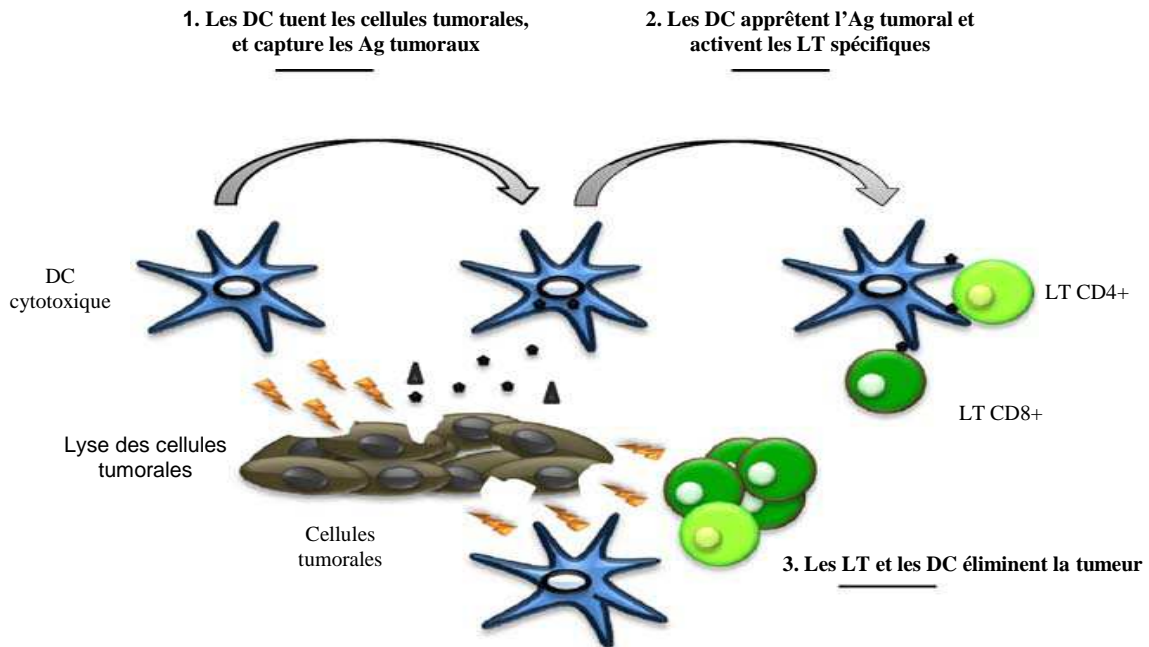


Figure 18 : Rôle potentiel des DC cytotoxiques dans la réponse immunitaire antitumorale (d'après Larmonier et *al.*, 2010).

Chapitre IV.

LES MACROPHAGES

Comme les DC, les macrophages se caractérisent par une grande hétérogénéité et sont dotés d'une remarquable plasticité fonctionnelle. Les deux types cellulaires de l'immunité innée peuvent être générés *in vitro* à partir des monocytes circulants du sang périphérique. Cette approche expérimentale permet d'étudier et de mieux comprendre la physiologie de ces cellules. De nombreux stimuli, notamment inflammatoires, modulent leur phénotype et leurs activités. En fonction de leurs conditions d'activation, les macrophages, comme les DC décrites précédemment, peuvent intervenir dans la protection de l'organisme ou dans les mécanismes physiopathologiques inducteurs de certaines pathologies. La connaissance de leur fonctionnement devrait permettre de mieux maîtriser les interventions thérapeutiques.

1. Généralités

Les macrophages se différencient à partir d'un progéniteur myéloïde médullaire qui donne naissance aux monocytes. Les monocytes sont libérés dans la circulation, migrent, à l'état basal ou en réponse à une inflammation, dans les tissus et se différencient en macrophages. Les monocytes circulants représentent en fait une population hétérogène de cellules. A l'heure actuelle, le type de monocyte circulant qui va donner naissance à des macrophages n'est pas parfaitement connu (Mosser et *al.*, 2008).

Il existe **différentes populations de macrophages**, avec des fonctions différentes, modulées par l'environnement dans lequel ils se trouvent. Cette hétérogénéité rend leur classification difficile.

D'une manière classique, on sépare les macrophages en type M1, pour les macrophages activés par la voie classique, et en type M2, pour les macrophages activés par la voie alterne. Cette classification tient compte principalement du ratio IL-12 / IL-10 produit par les macrophages (Gordon et *al.*, 2003 ; Martinez et *al.*, 2008). D'autres auteurs considèrent qu'une catégorie de macrophages appelés macrophages régulateurs sont différents d'un point de vue biochimique et fonctionnel des macrophages activés par voie alterne (Edwards et *al.*,

2006). De ce fait, une autre classification a été récemment proposée qui prend en compte les trois grandes fonctions des macrophages dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme : la défense de l'organisme, la réparation tissulaire et la régulation immunitaire (Mosser et *al.*, 2008) (Figure 19). Il n'y a pas de démarcation nette entre ces types de macrophages, quelle que soit la classification utilisée.

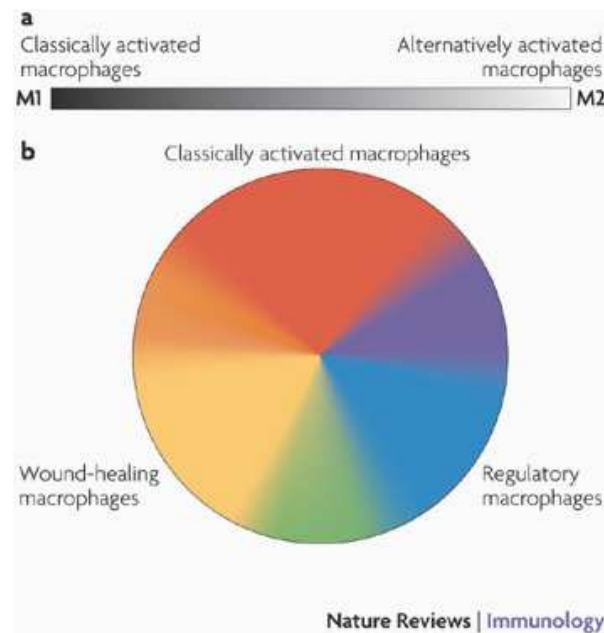


Figure 19 : Les principaux types de macrophages (d'après Mosser et *al.*, 2008.8.958).

Les macrophages sont des cellules phagocytaires très efficaces, participant à la clairance des débris cellulaires, des cellules apoptotiques et nécrotiques. Ils sont aussi des effecteurs très importants de l'immunité innée (Mosser et *al.*, 2008). D'une façon identique aux DC, les macrophages détectent les signaux danger via les TLR. Leur grande plasticité leur permet de répondre efficacement à des stimuli environnementaux très variés. Et comme pour les DC, le comportement des macrophages est beaucoup influencé et orienté par les signaux d'activation reçus (Figure 20).

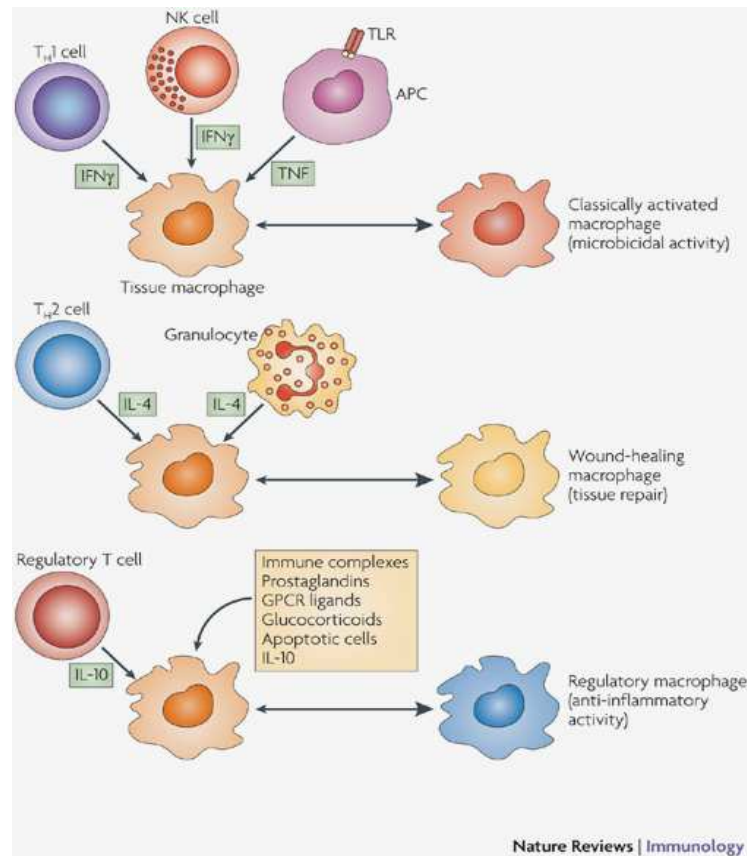


Figure 20: Les cytokines produites dans l'environnement des macrophages influencent leur fonction (d'après Mosser et *al.*, 2008).

Les macrophages M1 sont le résultat d'une activation par les PAMPs via des TLR, en présence d'IFN γ et de TNF α , aboutissant à la production de grandes quantités de cytokines comme IL-12, IL-23, IL-6, IL-1, TNF α . L'IFN γ peut être sécrété au cours d'une réponse immunitaire adaptative par les LTh1 ou par les LT CD8⁺, ou bien, au cours d'une réponse immunitaire innée, par les cellules NK. Le TNF α peut être sécrété par les cellules présentatrices d'Ag. Les macrophages M1 présentent une activité cytotoxique importante envers les microbes intracellulaires. Indispensables pour la défense de l'organisme, leur activation peut aboutir, via les cytokines et les divers médiateurs produits, à des dommages tissulaires importants. De ce fait, les macrophages M1 sont impliqués dans la pathogénèse des maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires intestinales, mais aussi dans le cancer (Bonnotte et *al.*, 2001 ; Mosser et *al.*, 2008).

Les macrophages M2 (« wound-healing » ou macrophages activés par la voie alterne) se différencient en réponse à l'IL-4, produite par les lymphocytes Th2 ou les granulocytes. Ils interviennent dans la réparation tissulaire. En effet, une des premières cytokines libérées en

réponse à une lésion tissulaire est l'IL-4, sécrétée par les basophiles et les mastocytes. L'IL-4 stimule l'activité arginase des macrophages et la production des substances de la matrice extracellulaire. Les macrophages M2 interviennent également dans la réponse contre les helminthes (Mantovani et *al.*, 2005 ; Mosser et *al.*, 2008).

Les macrophages régulateurs se développent en réponse à différents stimuli tels que les complexes immuns, les prostaglandines, les glucocorticoïdes, l'IL-10, les cellules apoptotiques. Ils produisent de grandes quantités d'IL-10 et ont des propriétés immunosuppressives (Mosser et *al.*, 2008).

Les macrophages jouent un rôle fondamental dans plusieurs pathologies. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à leur rôle dans l'athérosclérose.

2. Mécanismes immunologiques et inflammatoires de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de large et moyen calibre, à l'origine des maladies cardiovasculaires. Cette pathologie complexe fait intervenir les **composants des systèmes vasculaire, métabolique et immunitaire**. Deux éléments clés du processus athérogène sont représentés par l'accumulation des lipoprotéines LDL (*Low Density Lipoprotein*) dans la paroi vasculaire et le recrutement des monocytes dans les vaisseaux, avec leur différenciation en macrophages et leur transformation en cellules spumeuses. Les lésions d'athérosclérose sont associées à un état inflammatoire chronique qui aura un effet délétère sur leur évolution. Bien que le déséquilibre des lipoprotéines reste le facteur de risque principal, les mécanismes immunologiques et inflammatoires sous-jacents ont suscité un intérêt de plus en plus important dans les 20 dernières années (Hansson et *al.*, 2006).

La lésion histologique classique de l'athérosclérose est la **plaque d'athérome** au niveau des artères. La plaque d'athérome est constituée de cellules musculaires lisses inflammatoires, de cellules endothéliales, de cellules spumeuses, de régions de calcification et d'un infiltrat de cellules immunitaires (Ross et *al.*, 1999). L'infiltrat de cellules immunitaires, organisé en

structures *lymphoid-like*, a fait naître le terme *Vascular-Associated Lymphoid Tissues* (VALT) (Wick et *al.*, 1997).

Cet infiltrat retrouvé dans les lésions athérosclérotiques des intima des vaisseaux est constitué de macrophages, de cellules dendritiques, de lymphocytes et d'autres cellules inflammatoires (Galkina et *al.*, 2009) (Figure 21).

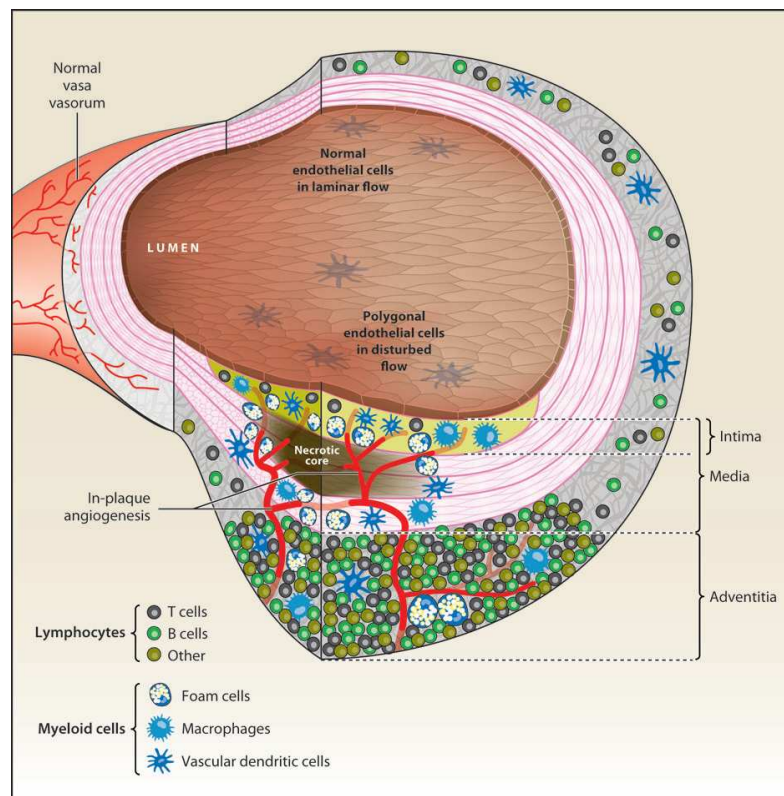


Figure 21 : L'infiltrat inflammatoire et immunitaire dans les lésions d'athérosclérose (d'après Galkina et *al.*, 2009).

Le recrutement de monocytes circulants, à l'origine de l'infiltrat inflammatoire, est augmenté et favorisé par l'expression par l'endothélium inflammatoire des molécules d'adhésion comme la P-selectine, les β -intégrines et le VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et par une concentration importante de nombreuses chimiokines (Galkina et *al.*, 2007). D'une manière générale, les monocytes circulants entrent dans divers tissus et se différencient en macrophages ou en DC qui peuvent ensuite recirculer via la circulation lymphatique. Le nombre de DC et de macrophages est significativement augmenté dans les artères athéromateuses. Cela s'explique par le recrutement important des monocytes et par une

diminution de la migration CCR7-dépendante des DC, avec une plus grande séquestration locale (Trogan et *al.*, 2006).

Les DC infiltrant l'intima des artères présentent un phénotype semblable à celui des cellules de Langerhans (Bobryshev et *al.*, 1995). Leur rôle au niveau lésionnel n'est toujours pas bien compris à ce jour. On les retrouve dans des zones de néovascularisation, au contact des lymphocytes, suggérant que ces DC présenteraient des Ag aux lymphocytes. Cette hypothèse est soutenue par des expériences de présentation antigénique utilisant des souris transgéniques pour le TCR et des DC chargées en peptides antigéniques ou des DC isolées des parois vasculaires (Galkina et *al.*, 2009). Ainsi, les DC pourraient présenter des Ag associés à l'athérosclérose et activer la différenciation et la prolifération lymphocytaire en orientant leur polarisation.

Un recrutement accéléré des **lymphocytes T** dans l'aorte a été observé, autant dans les stades précoces que dans les stades avancés de l'athérosclérose (Galkina et *al.*, 2007). La plupart des lymphocytes sont TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ et ont un phénotype activé. Des lymphocytes spécifiques des lipoprotéines oxydées et des HSP ont été également observés dans les plaques, suggérant une activation et une prolifération locale au cours de l'athérogenèse (Hansson et *al.*, 1989 ; Rossmann et *al.*, 2008). Dans les stades précoces, on observe une polarisation Th1, avec production d'IFN γ , d'IL-6 et d'anticorps IgG2 anti-LDL (Zhou et *al.*, 1998). La présence d'une réponse immunitaire envers les Ag du soi comme la HSP-60 et les LDL fait considérer l'athérosclérose comme une maladie auto-immune (Wick et *al.*, 2004). Le rôle de la polarisation Th1 dans l'athérosclérose a été prouvé par Buono et *al.* (2005) qui montrent que le déficit en Tbet (facteur de transcription de la polarisation Th1) s'associe à une athérogenèse réduite.

L'équilibre de la réponse immunitaire Th1 et Th2 est étroitement régulé par les **lymphocytes Treg**, critiques pour la maintenance de la tolérance immunologique. Les expériences de transfert adoptif de cellules de moelle ne contenant pas de Treg CD4⁺CD25⁺ montrent une augmentation des lésions d'athérome. Ces travaux suggèrent que les LTreg naturels inhibent le développement de l'athérosclérose (Ait-Oufella et *al.*, 2006).

L'implication **d'autres cellules immunitaires** (les LT $\gamma\delta$, les cellules NK, les mastocytes, les lymphocytes B, les neutrophiles) dans l'athérosclérose a été également rapportée (Galkina et *al.*, 2009).

De plus en plus de preuves confirment que non seulement les médiateurs métaboliques mais aussi des infections bactériennes ou virales contribuent à l'amplification du processus athérogène en induisant un **état inflammatoire** dans les parois vasculaires (Galkina et *al.*, 2009). L'athérosclérose est un processus dynamique et l'inflammation accompagne toutes les étapes de l'athérogenèse. L'inflammation va conduire à la formation, la progression et la rupture de la plaque d'athérome (Libby et *al.*, 2010).

L'inflammation est en grande partie due à l'activation des cellules de l'immunité innée via les TLR. Les **TLR** sont des récepteurs du système immunitaire inné qui reconnaissent des motifs structuraux conservés des pathogènes. Le TLR-2 et le TLR-4 sont également les récepteurs des HSP60 (Frantz et *al.*, 2007). Les souris déficitaires en MyD88, molécule faisant partie de la cascade de signalisation des TLR, présentent une athérosclérose réduite (Bjorkbacka et *al.*, 2004). L'activation des TLR induit la maturation des DC, la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et la production du monoxyde d'azote par les macrophages.

3. Les macrophages dans l'athérosclérose

Les macrophages interviennent dans l'athérosclérose à deux niveaux : en tant qu'effecteurs immunitaires de l'inflammation, mais aussi comme cellules phagocytaires capables, grâce à des récepteurs éboueurs, d'internaliser les lipides.

Les macrophages ont été identifiés comme les premières **cellules inflammatoires** associées à l'athérosclérose (Gerrity et *al.*, 1980). Ils s'accumulent progressivement dans les lésions et, au fur et à mesure de l'évolution, ils prennent un phénotype inflammatoire et produisent des cytokines pro-inflammatoires (Martin-Fuentes et *al.*, 2007). Cette production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages résidents de la plaque amène à considérer l'athérosclérose comme une maladie inflammatoire.

Les macrophages expriment des PRR, incluant les SR (*Scavenger Receptor*) et les TLR. Grâce à ces récepteurs, les macrophages phagocytent les microbes et divers composants microbiens mais capturent aussi les lipoprotéines (notamment les LDL modifiées) pour former des cellules spumeuses. Par l'intermédiaire des TLR, l'exposition des macrophages aux LPS ou à *Chlamydia pneumoniae*, peut favoriser la formation des cellules spumeuses (Byrne et al., 1999).

La stimulation des récepteurs par les PAMPs s'accompagne d'une libération par les macrophages de cytokines inflammatoires comme IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TNF α , mais aussi de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) et de facteurs angiogéniques comme le VEGF. Ainsi, les macrophages peuvent avoir un rôle proathéromateux, en amplifiant la réponse inflammatoire locale par la production des cytokines inflammatoires et en produisant des lésions tissulaires par la libération des radicaux oxygénés toxiques. Cependant, certains sous-types de macrophages peuvent participer à la réparation tissulaire et à la restauration d'une homéostasie locale (Wilson et al., 2010) (Figure 22). D'ailleurs, les macrophages des deux types de polarisation, M1 et M2, sont retrouvés dans les lésions d'athérosclérose (Galkina et al., 2009) et l'équilibre entre les sous-populations va influencer l'évolution des lésions (Mantovani et al., 2009).

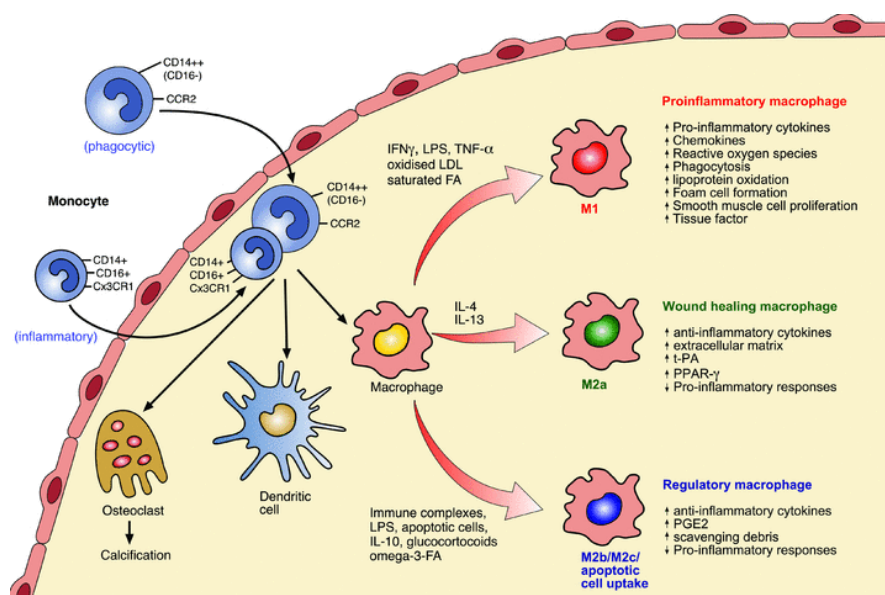


Figure 22 : Hétérogénéité des macrophages au niveau de la lésion athéromateuse (d'après Wilson et al., 2010).

En tant que cellules phagocytaires, les macrophages des parois vasculaires **internalisent** via des récepteurs scavenger, **des lipides** et notamment des LDL oxydées. La dérégulation de l'influx et de l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages et les signaux inflammatoires, induisent la transformation des macrophages en cellules spumeuses, chargées en lipides. La conséquence locale sera la formation et la progression de la plaque d'athérome.

Le trafic des lipides au sein des macrophages ainsi que l'efflux du cholestérol excédentaire est un processus physiologique hautement régulé. Le cholestérol excédentaire ressort des macrophages des artères par l'intermédiaire des transporteurs cellulaires spécifiques de la famille ABC (*ATP-binding cassette transporter*) comme ABCA1 et ABCG1 (Yvan-Charvet et *al.*, 2007). Cette étape est très importante car elle empêche l'accumulation du cholestérol dans les macrophages et leur transformation en cellules spumeuses (Rader et *al.*, 2009).

De plus, l'efflux du cholestérol représente la première étape d'un processus appelé transport réverse du cholestérol (TRC). Il s'agit d'un processus physiologique par lequel l'excès de cholestérol cellulaire des tissus périphériques, dont les macrophages, retourne vers le foie dans le but d'être éliminé dans la bile, et par la suite, dans l'intestin. Ce transport est essentiel pour le maintien de l'homéostasie périphérique et systémique du cholestérol. Le cholestérol est pris en charge par les particules HDL (*High-Density-Lipoprotein*) circulantes et transporté jusqu'au foie, soit directement, soit après transfert du cholestérol aux lipoprotéines riches en apoB (Figure 23). Ce transfert est assuré par une protéine de transfert des esters de cholestérol, la CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*) (Rader et *al.*, 2009).

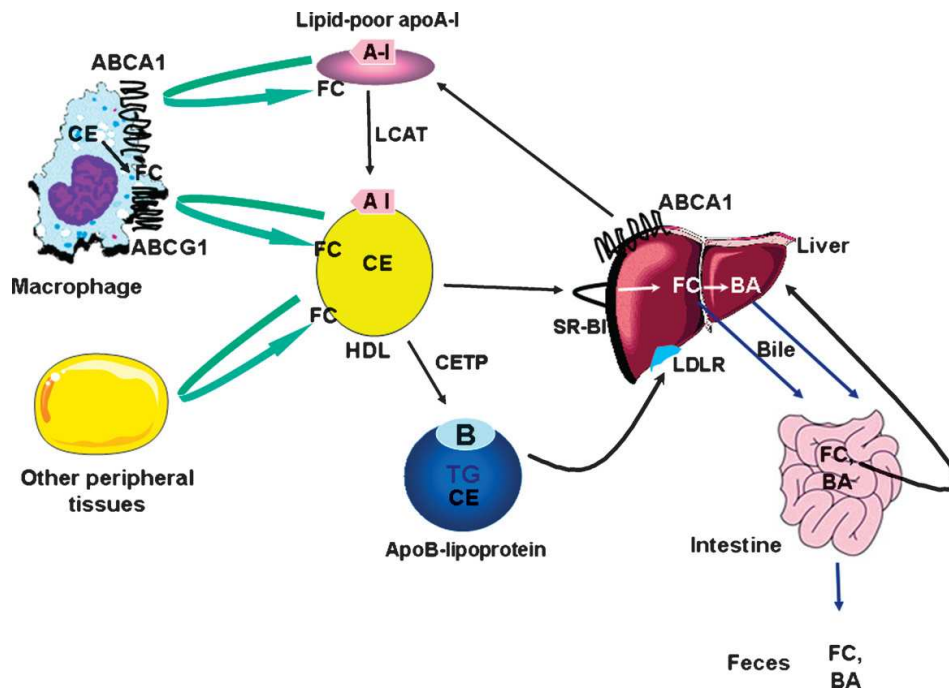


Figure 23 : Le transport réverse du cholestérol (d'après Rader et *al.*, 2009).

La **CETP** est une protéine de 74 kDa dont la structure cristallographique a été décrite récemment, confirmant la présence de sites de fixation des lipides neutres (Qiu et *al.*, 2007). Protéine absente chez la souris, elle est exprimée chez l'homme dans le foie, l'intestin, le tissu adipeux, la rate et les macrophages (Drayna et *al.*, 1987). L'expression génique de la CETP est stimulée par un régime riche en cholestérol et l'hypercholestérolémie endogène. Son expression est sous le contrôle des récepteurs nucléaires LXR/RXR (*Retinoid X Receptor*), facteurs de transcription activés par les oxystérols (Luo et *al.*, 2000). Dans la population japonaise, un déficit génétique en CETP, associé à des taux très élevés de HDL-cholestérol a été décrit (Brown et *al.*, 1989). Les conséquences de ce déficit sur la survenue des accidents vasculaires restent contradictoires (Masson et *al.*, 2009).

La CETP facilite le transfert des esters de cholestérol entre les lipoprotéines antiathérogènes (HDL) et proathérogènes, riches en apoB (LDL et VLDL : *very low density lipoprotein*). Par ce mécanisme, la CETP diminue le taux des HDL, suggérant un effet proathérogène. En revanche, par le remodelage des particules HDL, la CETP va libérer l'apoA-I. L'apoA-I est le principal accepteur des lipides venant de l'efflux du cholestérol, diminuant ainsi la formation des cellules spumeuses. Par ce mécanisme, la CETP peut être considérée comme un facteur antiathérogène (Masson et *al.*, 2009).

Des études chez la souris transgénique, exprimant le gène de la CETP humaine, rapportent des résultats contradictoires quant à l'effet de cette protéine dans l'athérogénèse : l'expression de la CETP dans un modèle de souris hypercholestérolémiques augmente l'athérosclérose (Plump et *al.*, 1999), alors que dans un modèle de souris hypertriglycéridémiques, son expression peut être anti- ou proathérogène (Hayek et *al.*, 1995).

Les résultats chez l'homme et chez l'animal sont en accord avec un rôle complexe de la CETP dans l'athérosclérose. Par son rôle majeur dans le TRC, la CETP est une cible thérapeutique importante. Des stratégies d'inhibition de la CETP ont été tentées dans le but d'augmenter le niveau des HDL, considérées comme étant « le bon cholestérol ». Néanmoins une large étude clinique utilisant un inhibiteur de la CETP, le torcetrapib, a été arrêtée prématurément à cause d'une augmentation significative des incidents cardiovasculaires et de la mortalité, malgré une augmentation des taux de HDL-cholestérol (Barter et *al.*, 2007).

CONCLUSION

CONCLUSION

Modulation des cellules dendritiques : implications dans le cancer

1. Le rationnel de l'étude

L'efficacité clinique des protocoles de vaccination antitumorale reste modeste et une amélioration des stratégies d'immunothérapie est nécessaire pour une utilisation optimale des DC. En effet, la propriété cytotoxique des DC envers des cellules tumorales ouvre de nouvelles perspectives. Cependant, à ce jour, les résultats des études sur les DC cytotoxiques sont hétérogènes ; la caractérisation de la cytotoxicité et son mécanisme est insuffisante, notamment chez l'homme, et aucune étude clinique n'a encore délibérément exploité cette propriété. Les DC cytotoxiques générées *ex vivo* pourraient être considérées comme un nouvel outil thérapeutique. Ces DC cytotoxiques générées *ex vivo* auront des propriétés et des fonctions différentes des celles des DC non activées ou des DC infiltrant les tumeurs.

Notre étude, chez la souris et chez l'homme, apporte des éléments nouveaux à prendre en compte dans la compréhension des DC cytotoxiques.

2. Le modèle

Nous avons utilisé des DC dérivées de la moelle osseuse des souris, cultivées en présence de GM-CSF et IL-4, et sélectionnées à J7 par un tri magnétique CD11c. Chez l'homme, nous avons utilisé des DC dérivées des monocytes du sang périphérique isolés par tri magnétique CD14. Il s'agit d'une technique largement utilisée pour la génération des DC humaines dans un but thérapeutique. La différenciation des monocytes en DC a été vérifiée phénotypiquement à chaque expérience.

Ce modèle à deux avantages : il nous a permis d'obtenir de grandes quantités de DC d'une part et d'analyser une population homogène et pure, exempte de toute contamination cellulaire, d'autre part.

3. Le ratio cellules dendritiques / cellules tumorales cible

Chez l'homme, l'activité cytotoxique des DC ainsi générées a été observée pour des ratios faibles de cellules dendritiques / cellules tumorales. Une activité cytotoxique commence à être observée pour des ratios de 2,5/1 et une cytotoxicité de 40-80 % est atteinte à des ratios de 5/1. Ces résultats obtenus chez l'homme ont été confirmés par notre équipe chez le rat (Nicolas et *al.*, 2007) et chez la souris (Fraszczak et *al.*, 2010). Dans d'autres études, des ratios souvent beaucoup plus importants ont été utilisés, de 20 à 50 DC pour une cellule tumorale (Fanger et *al.*, 1999 ; Shi et *al.*, 2005) mais une telle quantité de DC ne semble pas correspondre à l'infiltration tumorale réelle par les DC. Cependant, d'après nos résultats chez l'homme, l'effet cytotoxique est perdu pour un ratio de 1 DC pour 1 cellule tumorale.

La conclusion pratique qui en découle est que, pour que les DC puissent exercer leur fonction cytotoxique, elles doivent être en quantité suffisante au site tumoral.

4. L'état de maturation des DC cytotoxiques

L'état de maturation des DC conditionne leurs fonctions. Nous avons testé le potentiel cytotoxique des DC humaines, immatures ou matures, et avons observé une cytotoxicité uniquement en présence des DC immatures.

Cette observation est en accord avec la biologie des DC : à l'état immature, elles forment un réseau sentinelle capable de capturer et d'éliminer les pathogènes (Banchereau et *al.*, 2000). D'autres articles ont rapporté également l'implication des DC immatures dans l'effet cytotoxique antitumoral, mais avec une cytotoxicité relativement faible pour un ratio de 5/1, ratio que nous avons utilisé dans la majorité des expériences (Janjic et *al.*, 2002 ; Vandenheyde et *al.*, 2001 ; Vandenheyde et *al.*, 2004).

Dans nos expériences, l'effet cytotoxique a été perdu au stade mature (défini phénotypiquement et fonctionnellement par la sécrétion de l'IL-12 et par la diminution de la capacité d'endocytose). En revanche, chez le rat et la souris, ce sont les DC matures qui sont cytotoxiques, montrant encore une fois les différences qui peuvent exister entre les espèces. Ceci souligne encore l'importance des travaux chez l'homme, les résultats obtenus chez le rongeur ne sont pas toujours transposables à l'espèce humaine.

Une cytotoxicité spontanée a été rapportée dans certaines études, mais nous ne l'avons pas retrouvée dans nos expériences (Janjic et *al.*, 2002 ; Manna et *al.*, 2002 ; Vandenhayde et *al.*, 2004). La comparaison est difficile avec les autres études car le ratio utilisé a été souvent plus important et, en fonction des conditions d'obtention et de manipulation, les DC peuvent présenter des degrés d'activation différents. De plus, les trois articles cités plus haut ont utilisé, comme méthode d'obtention des monocytes, l'adhérence des cellules mononucléées sur un support plastique. Cette méthode ne garantit pas l'absence de contamination, même minime, par d'autres cellules cytotoxiques, comme les macrophages ou les cellules NK. Enfin, sur le plan théorique, il paraît plus logique que les DC ne soient pas spontanément cytotoxiques, car cela pourrait provoquer d'importants dommages tissulaires.

En conclusion, nos résultats montrent que les DC humaines immatures ont des potentialités cytotoxiques après stimulation par les LPS.

5. Les agonistes des TLR

Les DC expriment des TLR et peuvent ainsi recevoir des « signaux danger » provenant de l'environnement. Nous avons testé plusieurs agonistes des TLR ; cependant, l'effet cytotoxique n'a été obtenu chez l'homme qu'avec l'agoniste de TLR-4, les LPS. Dans la littérature, une cytotoxicité des DC activées par d'autres ligands des TLR a été rapportée :

- l'agoniste de TLR-7 (resiquimod / R848) et l'agoniste de TLR-9 (CpG ODN) augmentent la cytotoxicité antitumorale, mais il s'agissait dans cette étude d'une lignée cellulaire humaine obtenue à partir des DCp leucémiques (Chaperot et *al.*, 2006) ;
- l'agoniste de TLR-7/8 (imiquimod) augmente la cytotoxicité des DCm isolées du sang périphérique des patients porteurs de carcinome basocellulaire, néanmoins le pourcentage de lyse reste faible, autour de 10 % (Sary et *al.*, 2007) ;
- un effet antitumoral a été rapporté après activation par IL-18 et CpG, mais là encore il s'agissait d'une population bien particulière de cellules murines, les NKDC (Chaudhry et *al.*, 2006).

Nos résultats chez la souris ont montré l'induction d'une cytotoxicité avec les LPS mais également avec Pam3Cys-SK4, un agoniste de TLR-2.

Le niveau et le type d'activation pourraient être différents en fonction de la nature de l'agoniste des TLR et du sous-type de DC (Dowling et *al.*, 2008). En effet, la fixation du ligand sur les TLR aboutit à un assemblage complexe et sélectif des protéines adaptatrices

cytoplasmiques et à une cascade de phosphorylations. La molécule adaptatrice centrale est la MyD88 (*myeloid differentiation antigen 88*) mais la signalisation TLR-4 emploie également une voie alternative via TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) (Barton et *al.*, 2009). La cascade de signalisation des TLR aboutit à l'activation des facteurs de transcription dans une combinaison très complexe expliquant que des changements subtils puissent aboutir à des réponses cellulaires différentes (Akira et *al.*, 2003).

Les voies de signalisation de cette induction spécifique de la cytotoxicité par un seul activateur des TLR restent à déterminer.

6. L'effet des LPS

Les LPS sont connus comme des signaux d'activation puissants pour les DC, favorisant leur maturation (Banchereau et *al.*, 2000). Nous avons montré que les LPS induisent une cytotoxicité très importante des DC immatures, mesurée par une perte de viabilité des cellules tumorales de 60 à 80 %. Au bout de 48 h de coculture DC-cellules tumorales en présence de LPS, les DC cytotoxiques, immatures au début de l'expérience, acquièrent un phénotype mature. Le signal délivré par les LPS peut donc jouer le rôle d'inducteur de cytotoxicité et de maturation. Ainsi, les LPS auraient un double rôle. Cela est d'autant plus important que les DC infiltrant les tumeurs sont souvent bloquées à un stade immature ne pouvant pas activer les lymphocytes (Bonnotte et *al.*, 2004 ; Chaux et *al.*, 1997).

A l'inverse, les LPS n'induisent aucune cytotoxicité chez des DC matures. Du fait que le cocktail induisant la maturation peut influencer sur la différenciation et la maturation des DC, nous avons testé plusieurs stimuli de maturation : LPS, TNF α + poly-IC, IFN γ ou le gold standard utilisé dans la majorité des études cliniques, un mélange comprenant IL-1 β , IL-6, TNF β et PGE2. Quel que soit le stimulus de maturation, les DC matures ne répondent plus aux LPS par une activité cytotoxique. L'utilisation d'autres stimuli de maturation que les LPS nous a permis d'éliminer un éventuel « épuisement » de la réponse aux DC matures lors d'une deuxième stimulation par les LPS. Ceci confirme que la cytotoxicité chez l'homme est réservée aux DC immatures. Cette double fonction (cytotoxicité / présentation d'Ag) évoluant en fonction de la maturation a été déjà rapportée pour une catégorie de DC murines, les IKDC (Himoudi et *al.*, 2009 ; Zitvogel et *al.*, 2008).

Les LPS sont de puissants activateurs des DC qui ont souvent été utilisés à des doses très élevées soit 5 µg/ml (Chapoval et *al.*, 2000 ; Shi et *al.*, 2005), soit 10 µg/ml (Manna et *al.*, 2002). Dans notre étude nous montrons que des doses de 100 ng/ml suffisent pour induire une cytotoxicité significative, aussi bien chez l'homme ou chez la souris.

Dans des études précédentes, les DC ont été souvent utilisées pour leur effet cytotoxique après un prétraitement par les LPS de 12 ou 24 h, quand le processus de maturation a été déjà enclenché (Chapoval et *al.*, 2000 ; Liu et *al.*, 2001 ; Vanderheyde et *al.*, 2001). Cela peut tout à fait expliquer les différences de cytotoxicité remarquées, ainsi que les différences dans la définition des stades de maturation des DC.

Dans certaines études, un prétraitement suivi d'un lavage soigneux des DC a été réalisé dans le but d'éliminer toute interférence des LPS avec la viabilité tumorale (Liu et *al.*, 2001 ; Vanderheyde et *al.*, 2001). Dans nos expériences, l'incubation des cellules tumorales avec les LPS ne modifie pas leur viabilité. Ainsi, nous avons éliminé un effet direct des LPS sur la viabilité des cellules tumorales. De même, le prétraitement des cellules tumorales par les LPS ne modifie pas la cytotoxicité des DC. Cette observation nous permet d'éliminer un effet de sensibilisation des cellules tumorales par les LPS. Ces résultats ont été confirmés chez le rat et la souris.

Les LPS constituent un composant de la paroi externe des bactéries à Gram négatif. Les LPS comportent trois régions : une chaîne O qui apporte la variabilité entre les sérotypes, un noyau et le lipide A, la partie biologiquement active (Erridge et *al.*, 2002). A cause des activités endotoxiques des LPS chez l'homme, leur utilisation thérapeutique reste délicate et des analogues synthétiques du lipide A ont été développés. Parmi eux, le 3-O- desacyl-4'-monophosphoryllipid A (MPL) a été évalué dans des essais cliniques en tant qu'adjuvant des vaccins anticancéreux. Il semble capable d'activer le système immunitaire sans pour autant partager les effets toxiques des LPS (Johnson et *al.*, 2008 ; Cluff et *al.*, 2009 ; Sassi et *al.*, 2009).

Il serait utile de tester ces analogues et de vérifier l'induction de la réponse cytotoxique.

7. Le mécanisme de cytotoxicité

Nos résultats sont en faveur d'un mécanisme cytotoxique non spécifique, comme le montre la sensibilité aux DC cytotoxiques d'une grande variété de lignées tumorales, ainsi

que de cellules non tumorales (nous avons utilisé des cellules embryonnaires humaines et des cellules musculaires lisses de l'aorte de rat). Quelques études rapportent une cytotoxicité uniquement envers les cellules tumorales, en épargnant les cellules normales (Janjic *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2005). Néanmoins, les auteurs n'ont pas fourni d'explication et n'ont pas mis en évidence de récepteurs spécifiques des cellules tumorales ou un quelconque mécanisme de reconnaissance des tumeurs par les DC cytotoxiques. Le caractère non spécifique soulève en revanche d'autres questions qui doivent être prises en compte dans l'optique d'une utilisation thérapeutique de ces cellules. Ne reconnaissant pas spécifiquement les cellules tumorales, les DC risquent de tuer d'autres cellules qui pourraient être utiles, voire se tuer elles-mêmes. Dans nos expériences préliminaires, un petit pourcentage de DC cytotoxiques meurt durant les cultures mais cette destruction est très éloignée de la cytotoxicité envers les cellules tumorales. Les DC cytotoxiques possèdent-elles des mécanismes de résistance ou de protection ? Cela reste à élucider. Une autre question importante concerne la cytotoxicité qui peut être orientée vers les lymphocytes. Cependant, la rencontre avec les lymphocytes se fera dans les ganglions lymphatiques. A cet instant, les DC auront déjà effectué leur maturation et perdu leur caractère cytotoxique. En effet nous avons montré que les DC cytotoxiques perdent le pouvoir cytotoxique en acquérant les propriétés des DC matures.

Nos résultats ont montré la nécessité d'un contact cellulaire pour la mise en œuvre de la cytotoxicité, mécanisme déjà suggéré par Chapoval *et al.* (2000). Nous avons confirmé ces observations en utilisant des expériences de « transwell », chez l'homme et chez la souris.

Plusieurs mécanismes de cytotoxicité des DC ont été décrits :

- le NO (Nicolas *et al.*, 2007) ;
- les récepteurs de mort (Chaperot *et al.*, 2000 ; Fanger *et al.*, 1999 ; Griffith *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2002 ; Manna *et al.*, 2002 ; Sary *et al.*, 2007 ; Shi *et al.*, 2005 ; Vidalain *et al.*, 2001) ;
- le système perforine-granzyme (Sary *et al.*, 2007) ;
- l'interaction CD40/CD40L (Hill *et al.*, 2008).

Cette grande diversité de mécanismes peut s'expliquer par l'utilisation dans les études des sous-types de DC différents, provenant d'espèces différentes, stimulées par des signaux différents. De même, le mode de préparation parfois non exempt de contamination par des LPS ou par d'autres populations cellulaires cytotoxiques comme les cellules NK ou des macrophages expliquent aussi en grande partie ces résultats différents. Mais, il ne faut pas

négliger la grande plasticité fonctionnelle des DC et il est fort probable que les DC puissent acquérir des propriétés cytotoxiques et utiliser des mécanismes de cytotoxicité différents en fonction de leur environnement.

Nos études, que ce soit chez le rat, la souris ou l'homme, ont permis de définir clairement des mécanismes cytotoxiques.

L'implication des récepteurs de mort a été éliminée autant chez l'homme que chez la souris. Chez l'homme, les DC cytotoxiques tuent les cellules HT29 (adénocarcinome de côlon), qui sont naturellement résistantes à la cytotoxicité induite par TRAIL. Pour confirmer ces résultats, nous avons montré que les DC cytotoxiques tuent des cellules tumorales (HCT116 et Sw480) rendues résistantes à la mort induite par TRAIL, secondairement à la transfection de cFLIP (FLICE inhibitory protein), molécule anti-apoptotique. Chez la souris, l'utilisation des Ac bloquants anti-TRAIL n'a pas restauré la viabilité tumorale.

Dans les études rapportant l'implication de TRAIL, les DC cytotoxiques ont été activées par les IFN ou par des virus et non pas par les LPS (Fanger et *al.*, 1999 ; Liu et *al.*, 2001 ; Vidalain et *al.*, 2000). Ainsi, un traitement des DC dérivées des monocytes par IFN β augmente leur cytotoxicité envers des cellules tumorales par un mécanisme impliquant l'induction de TRAIL par l'IFN β . En revanche, cet effet n'a pas été observé après un traitement des mêmes DC par les LPS (Liu et *al.*, 2001). Cela suggère une différence dans l'expression de TRAIL en fonction des stimuli de maturation utilisés. Une seule étude a rapporté une cytotoxicité dépendante de TRAIL après stimulation par les LPS, mais les LPS étaient utilisées à très fortes doses (5 μ g/ml) et les DC dérivées du sang de cordon ombilical (Shi et *al.*, 2005).

Un mécanisme faisant intervenir l'exocytose des granules toxiques de perforine et granzymes semble également peu probable car l'addition dans la culture d'EGTA-Mg, un chélateur de calcium, n'a pas modifié la cytotoxicité ; ce résultat a été confirmé par une autre équipe rapportant une cytotoxicité indépendante de calcium (Yang et *al.*, 2001).

La cytotoxicité des DC rapportée dans notre étude fait intervenir un mécanisme non spécifique, dépendant d'un contact cellulaire, mais qui ne fait pas appel aux récepteurs de mort.

8. Le rôle des peroxynitrites dans la cytotoxicité

Etant donné que les LPS sont des produits d'origine bactérienne, nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme utilisé par les DC activées pour détruire les cellules tumorales était identique à celui utilisé pour l'élimination des bactéries. En effet, les DC dont l'activation a été induite par des ligands des TLR libèrent des radicaux oxygénés dans le but de tuer les agents pathogènes. Citons deux exemples : la maturation des DC humaines via les TLR induit l'activation de l'enzyme NADPH oxydase, indispensable pour l'élimination des bactéries *E. coli* (Vulcano et al., 2004). Cette enzyme est également impliquée dans la destruction des levures comme *Candida albicans* par les DC humaines traitées par l'IFN α ou l'IFN γ (Donini et al., 2007).

Le peroxynitrite (ONOO $^-$) résultent de la réaction entre le NO et l'anion superoxyde, aboutissant à un produit extrêmement toxique. Des résultats récents indiquent d'ailleurs que la cytotoxicité attribuée jusqu'à maintenant au NO est probablement due au peroxynitrite. Le peroxynitrite est un oxydant plus puissant que le NO ou le superoxyde (O $_2^-$), et peut interagir avec les lipides, l'ADN ou les protéines. Si le superoxyde et le NO sont synthétisés à proximité, ils interagissent très rapidement pour former du peroxynitrite. Dans des conditions inflammatoires, la production simultanée de superoxyde et de NO augmente de 1000 fois, alors que la formation du peroxynitrite augmente 1 000 000 fois (Pacher et al., 2007). Le peroxynitrite a été impliqué dans de nombreuses situations physiopathologiques en lien avec des lésions tissulaires et la cytotoxicité cellulaire. Son implication dans la physiopathologie des AVC, de l'ischémie myocardique et des dysfonctionnements cardiovasculaires liés au diabète a été rapportée (Virag et al., 2003).

La démonstration du rôle prédominant du peroxynitrite dans le mécanisme cytotoxique utilisé par les DC murines a nécessité l'utilisation de plusieurs techniques. Une quantité importante de métabolite du NO a été détectée dans les surnageants de culture des DC cytotoxiques ; cependant l'utilisation du NMMA (*N^G-methyl-L-Arginine*), un inhibiteur de la production de NO, n'a induit qu'une inhibition partielle de la cytotoxicité, ce qui nous a fait supposer que le NO n'était pas le médiateur toxique. Nous avons alors émis l'hypothèse que d'autres médiateurs toxiques dérivés du NO pouvaient être impliqués dans ce mécanisme cytotoxique. En effet le NO se combine très rapidement aux espèces radicalaires dérivées de l'oxygène comme les ions superoxydes générés par l'enzyme NADPH pour former alors des molécules cytotoxiques comme le peroxynitrite, molécule extrêmement toxique (Virag et al., 2003). Nous avons confirmé notre hypothèse tout d'abord en utilisant un agent accélérant le catabolisme du peroxynitrite qui a totalement inhibé la cytotoxicité des DC, puis en montrant

que les DC issues de souris KO pour iNOS ou gp91 (une sous-unité de la NADPH oxydase) n'étaient pas cytotoxiques après activation par les LPS.

Chez l'homme, nous avons mis en évidence la production du peroxynitrite par les DC cytotoxiques en utilisant une technique de résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette technique permet de s'affranchir du caractère instable des espèces radicalaires par l'utilisation d'une sonde stable, obtenue par l'oxydation dépendante des anions superoxydes et du peroxynitrite existant dans le milieu réactionnel (Dikalov et *al.*, 2007 ; Kuzkaya et *al.*, 2005). La RPE est actuellement la seule technique capable de détecter directement les espèces radicalaires (Tarpey et *al.*, 2004) pouvant être utilisée également *in vivo* (He et *al.*, 2002).

Dans notre étude, nous avons montré qu'un contact cellulaire était indispensable pour l'effet cytotoxique des DC. Ces résultats ne sont pas discordants avec l'implication des peroxynitrites dans la cytotoxicité des DC. En effet, le temps de demi-vie de ces espèces radicalaires est extrêmement court et une proximité avec la cellule cible est indispensable. La non spécificité de la mort cellulaire est aussi en concordance avec l'implication des peroxynitrites qui sont toxiques pour les cellules tumorales et les cellules normales.

Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, l'utilisation d'un catalyseur métabolique du peroxynitrite, le FeTPPS (5,10,15, 20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)prophyrinato iron (III) chloride), a drastiquement inhibé la cytotoxicité. Le FeTPPS a été déjà utilisé dans ce but dans plusieurs situations *in vivo* qui font intervenir la production du peroxynitrite :

- dans l'encéphalite auto-immune expérimentale (Bolton et *al.*, 2008) ;
- chez le rat, dans des conditions d'endotoxémie, où le FeTPPS prévient le dysfonctionnement cardiaque et l'inflammation (Lancel et *al.*, 2004) ;
- chez la souris sous régime gras où il améliore la sensibilité à l'insuline (Duplain et *al.*, 2008) ;
- chez le rat où il confère une protection au cours de la reperfusion cardiaque (Lauzier et *al.*, 2007).

Cependant, le peroxynitrite qui induit la mort des cellules tumorales pourrait être aussi toxique envers les lymphocytes. En effet, le peroxynitrite peut interférer avec l'activation des lymphocytes, il peut produire des S-nitrosylations du TCR empêchant une interaction correcte avec le complexe peptide-CMH et il peut induire l'apoptose des lymphocytes (Brito et *al.*, 1999 ; Nagaraj et *al.*, 2007). Dans nos expériences, les DC cytotoxiques induisent

l'alloprolifération des lymphocytes. L'explication réside probablement dans le fait que nous avons cocultivé les lymphocytes et les DC cytotoxiques 48 heures après l'activation, à un stade où les DC ne sont plus cytotoxiques, donc ne produisent plus de peroxy-nitrite. En effet, les DC cytotoxiques tuent principalement dans les premières 24 heures. L'ajout de FeTTPS dans la coculture DC-cellules tumorales 24 h après l'activation des DC n'a aucun effet sur la cytotoxicité. Ainsi, les événements cytotoxiques liés au peroxy-nitrite se déroulent principalement dans les 24 premières heures après l'activation et les DC devenues matures ne sécrètent plus de peroxy-nitrite.

Le mécanisme cytotoxique utilisé par les DC cytotoxiques implique la production de peroxy-nitrite.

9. La nature de la mort induite par les DC cytotoxiques

Le type de mort des cellules cancéreuses pourrait avoir une influence sur la réponse immunitaire antitumorale. Cependant, l'immunogénicité de la mort par apoptose, par nécrose ou par sénescence ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents restent controversés (Kroemer *al.*, 2007). Les études réalisées dans notre équipe n'avaient pas trouvé de lien entre le type de mort et la maturation et la fonctionnalité des DC (Larmonier et *al.*, 2006).

Dans ce travail, nous avons observé que la mort des cellules tumorales induite par les DC cytotoxiques humaines est une mort par nécrose, en accord avec le mécanisme cytotoxique impliquant le peroxy-nitrite (Bonfoco et *al.*, 1995). Pour éliminer un effet inhibiteur des cellules tumorales sur la maturation des DC nous avons comparé leur phénotype et leur capacité à induire une alloprolifération quand leur maturation s'effectue en présence ou en l'absence de cellules tumorales. En effet, de nombreux travaux ont montré un rôle inhibiteur de la tumeur sur la maturation des DC *in vivo*. Les DC infiltrant les tumeurs sont bloquées à un stade immature qui les empêche de présenter de façon efficace les Ag aux lymphocytes (Enk et *al.*, 1997 ; Nestle et *al.*, 1997 ; Troy et *al.*, 1998 ; Troy et *al.*, 1998).

Nos résultats montrent que la coculture des DC avec des cellules tumorales *in vitro* n'a pas d'effet sur leur maturation. Nous avons confirmé que la maturation des DC suite à l'activation par les LPS n'est pas modifiée par la coculture en présence de cellules tumorales. A la différence des DC soumises à un environnement tumoral, les DC cytotoxiques activées par les LPS cultivées *ex vivo* avec les cellules HT29 ne subissent pas d'effet immunosuppresseur

induit par les cellules cancéreuses et préservent leur capacité d'induire l'alloprolifération des LT.

En conclusion, les DC cytotoxiques générées ex vivo ne subissent pas de blocage de maturation sous l'influence des cellules tumorales.

10. La capture des Ag tumoraux et la stimulation des lymphocytes

Les DC cytotoxiques que nous avons générées ont la capacité de tuer les cellules tumorales et aussi de capturer des fragments tumoraux. En utilisant des cellules tumorales rendues fluorescentes par transfection de la GFP (*green fluorescent protein*), nous avons montré, chez la souris comme chez l'homme, que les DC ont la capacité de phagocyter des fragments tumoraux. Cette observation est confirmée par l'étude de Yang et *al.*, (2001) qui a mis en évidence, par immunofluorescence, la présence des fragments de noyaux apoptotiques de cellules tumorales au sein de DC cytotoxiques.

Les DC cytotoxiques que nous avons générées expriment des propriétés de DC immatures, ce qui leur permet de phagocyter les fragments des cellules qu'elles ont tuées. Ces DC immatures qui initialement ne peuvent pas présenter les Ag vont acquérir les caractères de DC matures après qu'elles étaient stimulées par les LPS. En effet, après 48 h de culture avec les cellules tumorales, et après avoir tué et phagocyté des cellules tumorales, les DC cytotoxiques présentent un phénotype mature, produisent de grandes quantités d'IL-12, et expriment les molécules de costimulation CD40, CD80, CD86. Elles présentent alors toutes les propriétés nécessaires pour l'activation des lymphocytes.

Plusieurs arguments plaident en faveur d'une présentation des Ag tumoraux par les DC. En effet, les DC sont particulièrement bien équipées pour présenter des Ag exogènes par l'intermédiaire des molécules de classe I du CMH, processus appelé présentation croisée (Heath et *al.*, 2004).

Pour analyser si les DC cytotoxiques étaient capables de présenter efficacement les Ag provenant des cellules tumorales qu'elles ont tuées, nous avons utilisé le modèle B16 OVA et les lymphocytes OTI. Dans ce modèle nous avons pu montrer que les DC tuent les cellules tumorales, capturent des fragments tumoraux et présentent l'Ag OVA à des lymphocytes OVA-spécifiques, induisant leur prolifération. Chez l'homme, plusieurs arguments concordent vers une potentialité des DC cytotoxiques à induire une réponse T : elles phagocytent des fragments tumoraux, elles sont dans un état mature, elles secrètent de l'IL-12 et sont capables d'induire une alloprolifération. Néanmoins, ces arguments ne sont pas suffisants et malgré plusieurs essais, des preuves directes d'une présentation croisée des Ag

tumoraux manquent encore. De plus, il faudra aussi s'assurer que les DC cytotoxiques, qui ont activé les lymphocytes T spécifiques des Ag des cellules tumorales tuées, ont induit une différenciation des lymphocytes T helper en Th1 et non pas en Treg.

11. Les DC cytotoxiques chez les patients cancéreux

Le résultat le plus important de notre travail est la démonstration qu'il est possible de générer des DC cytotoxiques à partir des monocytes des patients cancéreux. Toutes nos approches utilisant des modèles de rat et de souris et les expériences ayant inclus des sujets sains nous ont permis de tester de nombreuses hypothèses. Cela nous a permis de passer à l'étape suivante, l'étude chez les patients cancéreux, sachant que nous disposions alors d'un matériel sanguin limité. Aucune étude à ce jour n'a évalué le potentiel thérapeutique des DC cytotoxiques générées à partir de monocytes chez des patients cancéreux. Une seule étude a analysé le potentiel cytotoxique de monocytes isolés des liquides d'ascite de patientes souffrant d'un cancer de l'ovaire, procédé non utilisable d'une façon générale (Yang *et al.*, 2001).

L'inhibition de la capacité des précurseurs à se différencier en DC matures est un des mécanismes de suppression immunitaire par la tumeur (Rabinovitch *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous avons vérifié la capacité de différenciation des monocytes en DC isolés du sang de patients souffrant de cancers au stade métastatique. Nous avons analysé cette différenciation chez dix patients présentant des stades avancés de cancer. Nous avons montré que les monocytes de ces patients cancéreux peuvent se différencier *ex vivo* en DC en utilisant le protocole classique. Une étude récente sur 12 patients ayant un cancer de l'ovaire vient confirmer nos résultats. Même si la procédure d'obtention des DC diffère de la nôtre, les résultats montrent la possibilité de générer des DC, caractérisées uniquement sur le plan phénotypique, à partir de monocytes des patients cancéreux (Wertel *et al.*, 2010).

Dans notre étude, après avoir été activées par les LPS, les DC des patients cancéreux, quel que soit le type de tumeur, hématologique ou solide, ont présenté une activité cytotoxique. La cytotoxicité ainsi obtenue atteint le même niveau que celle des DC de sujets sains et implique le même mécanisme, celui du peroxy-nitrite. De plus, nous avons aussi reproduit les expériences réalisées avec des DC provenant de sujets sains en utilisant des DC provenant de patients présentant des cancers. Ainsi, nous avons montré que les DC cytotoxiques tuent les cellules tumorales et deviennent ensuite matures. Ces DC devenues matures sécrètent alors de

grandes quantités d'IL-12 et sont capables d'induire une alloprolifération lymphocytaire. Cette observation est très importante car elle ouvre la porte à l'utilisation chez les patients cancéreux de DC cytotoxiques fonctionnelles générées *ex vivo* à partir de leurs monocytes circulants, mises en culture avec les cellules tumorales autologues.

Modulation des macrophages : implications dans l'athérosclérose

1. L'argumentaire

Les macrophages jouent un rôle important dans le métabolisme lipidique ainsi que dans l'inflammation, et ont, de ce fait, une place centrale dans la pathogénèse de l'athérosclérose. Les macrophages constituent une population hétérogène qui peut jouer un rôle positif ou négatif dans l'athérosclérose. La modulation de l'activité des macrophages peut orienter la balance vers une direction pro- ou antiathérogène. Cette modulation passe par deux éléments clés : l'inflammation, induite par les LPS, et le métabolisme lipidique, régulé par les LXR. Ce sont les raisons pour laquelle, dans notre étude, nous avons étudié l'effet de ces deux modulateurs macrophagiques.

2. Le modèle

Pour l'étude des macrophages inflammatoires nous avons utilisé deux modèles. Des macrophages humains générés à partir des monocytes du sang périphérique, qui en présence de M-CSF se différencient *in vitro* en macrophages. Ces macrophages peuvent être orientés vers un profil inflammatoire de type M1 par divers agents inflammatoires (LPS, TNF α , IFN γ) (Mosser *et al.*, 2008). Chez la souris, nous avons utilisé des macrophages péritonéaux de souris transgéniques exprimant la CETP humaine, rendus inflammatoires par leur activation *in situ* par le thioglycolate injecté par voie intrapéritonéale.

3. Le dialogue TLR-4-LXR

Les LPS font partie des parois des bactéries à Gram négatif et leur reconnaissance est médiée par TLR-4, car l'invalidation du gène de TLR-4 chez la souris aboutit à une absence de réponse aux LPS (Takeuchi *et al.*, 1999). La fixation des LPS sur TLR-4 active une

cascade de signalisation qui aboutit à l'expression des gènes de l'inflammation et des gènes impliqués dans la production des radicaux oxygénés (Park et *al.*, 2004).

Les LXR sont des récepteurs nucléaires (facteurs de transcription activés par un ligand) qui interviennent dans le contrôle de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et l'inflammation (Zelcer et *al.*, 2006). Les récepteurs LXR sont exprimés au niveau des macrophages. Après activation par les oxystérols, ils forment des hétérodimères avec les récepteurs RXR et se fixent sur des éléments de réponse spécifiques contenus dans les promoteurs des gènes cibles (Willy et *al.*, 1995).

L'effet des agonistes LXR sur la réponse inflammatoire induite par les LPS a été étudié au niveau du profil transcriptionnel des macrophages *in vitro*. L'activation des LXR aboutit à une régulation négative de l'expression des gènes de l'inflammation dans les macrophages. Ainsi, les agonistes LXR inhibent l'expression des gènes de l'inflammation comme COX2 (cyclooxygénase) et IL-6, et de l'iNOS en réponse aux LPS (Joseph et *al.*, 2003). Des études de précipitation de la chromatine indiquent que les LXR se fixent sur le promoteur de TLR-4, et, par la suite, induisent la transcription de l'ARNm de TLR-4 et son expression protéique. L'effet des agonistes LXR sur l'expression des gènes de l'inflammation en réponse aux LPS semble être nuancé. Un prétraitement court, de 6h, par des agonistes LXR réduit la réponse inflammatoire des macrophages aux LPS, alors qu'un prétraitement de 48h provoque une augmentation de cette réponse (Fontaine et *al.*, 2007).

En revanche, l'effet d'un préconditionnement inflammatoire sur la réponse ultérieure des macrophages aux agonistes LXR n'a pas été étudié jusqu'à maintenant. Dans notre étude, nous montrons que l'expression de la CETP en réponse aux agonistes LXR présente un profil différent s'il s'agit des macrophages inflammatoires ou non.

4. L'expression de la CETP dans les macrophages noninflammatoires

Des arguments en faveur d'une expression de la CETP au niveau des macrophages ont déjà été rapportés dans la littérature. Une activité de transfert des esters de cholestérol pouvant correspondre à la CETP a été détectée dans le surnageant de culture des macrophages humains (Faust et *al.*, 1990 ; Tollefson et *al.*, 1985). L'ARNm de la CETP a été mis en évidence par des études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* au niveau des macrophages des parois vasculaires (Ishikawa et *al.*, 2001 ; Zhang et *al.*, 2001).

Dans notre étude, nous avons observé une induction de l'expression du gène de la CETP en réponse aux agonistes LXR au cours de la différenciation des monocytes en macrophages. Nos résultats sont en accord avec d'autres études qui ont rapporté une différence dans l'expression de la CETP en fonction de l'état de différenciation de la cellule, que ce soit les hépatocytes humains (Agellon et *al.*, 1992) ou les adipocytes (Gauthier et *al.*, 1999).

5. Signification de l'expression de la CETP au niveau macrophagique

Certaines études ont suggéré que la CETP produite au niveau des parois vasculaires pourrait prévenir l'accumulation du cholestérol dans les macrophages (Morton et *al.*, 1988 ; Zhang et *al.*, 2001). Nos résultats montrent que l'expression de la CETP est augmentée après la transformation des macrophages en cellules spumeuses par leur incubation *in vitro* avec des lipides. De plus, l'expression de la CETP est nettement augmentée quand les cellules spumeuses sont traitées par un agoniste LXR. Pour définir le rôle physiopathologique de cette augmentation de la CETP et pour pouvoir affirmer un rôle local de la CETP au niveau des macrophages vasculaires, des études d'efflux du cholestérol radioactif sont nécessaires.

Les macrophages peuvent-ils contribuer de façon significative au pool systémique de CETP ? Une étude élégante sur le rôle de la CETP des macrophages a été conduite chez des souris KO pour le récepteur LDL, transplantées avec la moelle osseuse de souris transgéniques CETP. Cette étude montre que la source majeure de la CETP circulante est représentée par les macrophages (Van Eck et *al.*, 2007). Dans notre étude, nous avons montré que l'activation des macrophages par les agonistes LXR aboutit à une augmentation de l'expression de l'ARNm de la CETP, mais aussi de son expression protéique. L'activité de transfert des esters de cholestérol a été détectée dans le surnageant de culture, ce qui prouve que la protéine est bien fonctionnelle.

6. L'expression de la CETP dans les macrophages inflammatoires

Nous avons montré que l'expression de la CETP en réponse aux agonistes LXR est nettement abolie dans les macrophages rendus inflammatoires, que ce soit chez l'homme ou chez la souris transgénique CETP. L'absence de réponse aux agonistes LXR semble concernée la CETP car les autres gènes cibles des agonistes LXR (ABCG1, ABCA1) n'ont pas subi de modifications. Dans ce sens, nous avons apporté des preuves *in vivo* chez la

souris : l'injection intrapéritonéale de LPS, avant administration de l'agoniste LXR, a diminué la capacité de transfert des esters de cholestérol au niveau plasmatique.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cet effet sont complexes, car l'activation, tant des TLR que des LXR, entraîne une cascade complexe de signalisation en aval. Ce mécanisme moléculaire peut dépendre du recrutement des facteurs de transcription ou de protéines activatrices ou répressives au niveau du promoteur de la CETP dans des conditions inflammatoires. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déchiffrer ce mécanisme.

Ces résultats suggèrent que la fonction des macrophages est différente selon le stade d'évolution de la plaque d'athérosclérose. A un stade précoce, où l'internalisation des LDL oxydées est le phénomène principal, les macrophages pourraient répondre aux agonistes LXR par une augmentation de la CETP. A un stade plus avancé, inflammatoire, les macrophages garderont leur fonction d'efflux de cholestérol via les transporteurs ABC non réprimés, mais répondront moins en ce qui concerne la CETP.

Les récepteurs LXR, par leur rôle central dans le métabolisme lipidique, représentent des cibles attractives dans le traitement de l'athérosclérose. Des agonistes LXR sont actuellement en développement. Malgré l'effet bénéfique des agonistes LXR, observé chez la souris, ils ne sont pas dénués d'effets secondaires, comme une lipogénèse augmentée et une hypertriglycémie (Fievet et *al.*, 2009). Les agonistes LXR augmentent également l'expression de la CETP ; en revanche le rôle pro- ou antiathérogène de la CETP reste sujet à controverse. Notre étude souligne que, dans des conditions inflammatoires, l'effet des agonistes LXR ne s'exprime pas par l'intermédiaire de la CETP, observation à prendre en compte dans les stratégies thérapeutiques de l'athérosclérose.

En conclusion, ce travail sur **les DC** nous a permis de montrer que :

- des DC peuvent être générées *ex vivo* à partir de monocytes humains du sang périphérique de patients atteints de divers cancers ;
- après activation par de faibles doses de LPS, les DC ainsi générées sont dotées d'une activité cytotoxique importante envers les cellules tumorales. Le mécanisme de cytotoxicité fait intervenir la production de peroxy-nitrite. Les DC cytotoxiques sont capables de capturer les cellules tumorales après les avoir tuées et, au bout de 48 h, expriment toutes les caractéristiques des DC matures.

Nous allons poursuivre nos travaux en incluant un plus grand nombre de patients et en essayant de prouver que les DC cytotoxiques humaines sont capables d'activer les lymphocytes spécifiques des Ag provenant des cellules tumorales qu'elles ont tuées. Cependant, pour avoir une efficacité antitumorale complète, il faut non seulement activer la réponse immunitaire antitumorale mais aussi inhiber l'effet immunosupresseur des LTreg. Nous nous assurerons que les DC cytotoxiques induisent une polarisation Th1 et pas une polarisation Treg.

L'utilisation de DC autologues cytotoxiques ouvre de nouvelles perspectives dans l'immunothérapie. Cette utilisation peut être envisagée de plusieurs façons :

1. par injection intratumorale de l'activateur dans le but de transformer les DC infiltrant les tumeurs en DC cytotoxiques. L'utilisation en application locale d'un agoniste des TLR a été rapportée avec succès dans une étude, sans apporter la preuve que la cytotoxicité des DC était à l'origine de l'élimination de la tumeur (Sary et *al.*, 2007).

Un autre aspect à prendre en compte est l'effet même des agonistes des TLR sur la survie et la prolifération cellulaire, l'agoniste de TLR-4 pouvant favoriser l'inflammation et la tumorigénèse (Li et *al.*, 2010).

Il faut être sûr de pouvoir activer les DC qui se trouvent dans un environnement tumoral hostile, souvent bloquées à un stade immature, et de l'existence d'un nombre suffisant de DC pour contrecarrer la croissance tumorale rapide.

2. par activation des DC en effecteurs cytotoxiques avant leur injection intratumorale. Le moment de l'injection peut être difficile à établir par rapport à la durée de l'effet cytotoxique. Par la suite, les DC doivent pouvoir migrer dans les ganglions. Cette stratégie a été tentée par Triozzi et *al.* (2000): l'injection intratumorale des DC générées à partir de monocytes de patients avec un cancer métastatique a abouti à la régression tumorale chez 4 patients porteurs de mélanome sur 7 et 2 patientes ayant un cancer du sein sur 3. Néanmoins, dans cette étude les DC ne présentaient pas d'effet cytotoxique.

Chez la souris, cette approche a significativement retardé la croissance tumorale sans pour autant induire de guérison. Des thérapeutiques combinées qui permettraient d'associer l'élimination des cellules tumorales avec la levée de l'immunosuppression et la restauration d'une immunité fonctionnelle devront donc être envisagées.

3. par génération *ex vivo* de DC cytotoxiques, à partir de patients cancéreux, puis injection sous forme vaccinale, en tant que DC porteuses d'Ag. Dans ce cas-là, l'injection pourrait se faire directement dans les ganglions, ce qui court-circuiterait l'étape de migration des DC et permettrait leur rencontre directe avec les lymphocytes. De cette façon, on pourrait éviter l'effet du microenvironnement tumoral. Cela a été montré dans une étude récente où les cellules tumorales empêchent l'expression du CCR7 sur les DC et donc leur migration (Villablanca et *al.*, 2010). Dans cette stratégie, l'effet cytotoxique sera exploité *ex vivo* et les propriétés de présentation d'Ag et d'activation des lymphocytes *in vivo*. Cela permettrait également de s'affranchir de l'effet éventuellement toxique de l'activateur utilisé. Les DC pourraient ainsi présenter un large panel d'Ag tumoraux. Ce protocole thérapeutique nous paraît le plus prometteur.

En ce qui concerne l'étude des **macrophages**, nous avons montré que l'inflammation influence leur réponse aux agonistes LXR, avec des conséquences sur l'expression de la CETP et des implications potentielles dans l'athérosclérose.

La CETP est une protéine régulatrice majeure de l'équilibre des lipoprotéines et une cible thérapeutique potentielle. Il a été montré que les macrophages contribuent au pool

plasmatique de CETP (Van Eck et *al.*, 2007). Nous allons poursuivre nos travaux en analysant la signification physiopathologique des macrophages inflammatoires en traitant des souris par les LPS et en étudiant l'effet cette fois-ci systémique de la CETP.

Un deuxième axe de recherche consistera en l'étude du rôle de la CETP dans l'immunité innée et l'inflammation. La CETP, protéine découverte par les lipidologues pour son effet de transfert des esters de cholestérol, est impliquée également dans l'inflammation aiguë et la réponse aux LPS. D'ailleurs, la CETP fait partie de la famille de LT-LBP (*lipid transfer - lipopolysaccharide-binding protein*), avec une autre protéine de transfert des lipides, la PLTP. Notre équipe a récemment montré le rôle de la PLTP dans l'immunité innée : l'expression de la PLTP favorise l'association du lipide A aux lipoprotéines en augmentant ainsi les effets proinflammatoires (Gautier et *al.*, 2010). En ce qui concerne la CETP, il a été montré qu'elle intervient en première ligne de défense contre la production exacerbée des médiateurs proinflammatoires (Cazita et *al.*, 2008). Son activité anti-inflammatoire s'exerce par l'intermédiaire des HDL, car la CETP favorise la fixation des LPS sur ces particules (Quintao et *al.*, 2010). Le rôle de la CETP dans l'immunité est un sujet en plein développement, ce qui nous incite à poursuivre les travaux dans ce sens.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

Adams S, O'Neill DW and Bhardwaj N. (2005). Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol* **25**, 87-98. Erratum in: *J Clin Immunol* **25**, 175. Corrected and republished in: *J Clin Immunol* **25**, 177-88.

Adema GJ. (2009). Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol Lett* **122**, 128-30.

Agellon LB, Zhang P, Jiang XC, Mendelsohn L and Tall AR. (1992). The CCAAT/enhancer-binding protein trans-activates the human cholesteryl ester transfer protein gene promoter. *J Biol Chem* **267**, 22336-9.

Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A and Mallat Z. (2006). Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* **12**, 178-80.

Akira S. (2003). Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **15**, 5-11. Erratum in: *Curr Opin Immunol* 2003 **15**, 238.

Akira S, Uematsu S and Takeuchi O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.

Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. (1998). Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* **4**, 1321-4.

Albert ML, Sauter B and Bhardwaj N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-9.

Albert ML, Jegathesan M and Darnell RB. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* **2**, 1010-7.

Alli R, Savithri B, Das S, Varalakshmi C, Rangaraj N and Khar A. (2004). Involvement of NKR-P2/NKG2D in DC-mediated killing of tumor targets: indicative of a common, innate, target-recognition paradigm? *Eur J Immunol* **34**, 1119-26.

Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP and Gabrilovich DI. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 1755-66.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ and Davis MM. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-6. Erratum in: *Science* 1998 **280**, 1821.

Alvarez D, Vollmann EH and von Andrian UH. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* **29**, 325-42.

Andrews DM, Maraskovsky E and Smyth MJ. (2008). Cancer vaccines for established cancer: how to make them better? *Immunol Rev* **222**, 242-55.

Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, Andr[√]© F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G and Zitvogel L. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**, 1050-9.

Aspord C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J and Palucka AK. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4⁺ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med* **204**, 1037-47.

Ayres FM, Narita M, Takahashi M, Yano T, Liu A, Toba K, Furukawa T and Aizawa Y. (2004). Human dendritic cells mediate anti-tumor activity against hematopoietic tumor cells without direct contact and Fas/FasL killing pathway. *Oncol Rep* **11**, 1017-23.

B

Bachem A, Güttler S, Hertung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S, KroczeK RA (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141 cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med.* 207(6):1273-81.

Banchereau J and Steinman RM. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B and Palucka K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.

Banchereau J and Palucka AK. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* **5**, 296-306.

Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B; ILLUMINATE Investigators. (2007). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* **357**, 2109-22.

Barton GM and Kagan JC. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* **9**, 535-42.

Batista FD and Harwood NE. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* **9**, 15-27.

Belkaid Y and Oldenhove G. (2008). Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* **29**, 362-71.

Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA and Banchereau J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* **190**, 1417-26.

Bellone G, Carbone A, Smirne C, Scirelli T, Buffolino A, Novarino A, Stacchini A, Bertetto O, Palestro G, Sorio C, Scarpa A, Emanuelli G and Rodeck U. (2006). Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J Immunol* **177**, 3448-60.

Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M and Noelle RJ. (2007). All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* **204**, 1765-74.

Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, Rimoldi D, Cerottini JC, Banchereau J and Palucka AK. (2000). Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* **192**, 1535-44.

Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE and Morris JC. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* **113**, 1515-25.

Birklé S, Zeng G, Gao L, Yu RK and Aubry J. (2003). Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* **85**, 455-63.

Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA, Means T, Halmen K, Luster AD, Golenbock DT and Freeman MW. (2004). Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* **10**, 416-21.

Blasius AL, Barchet W, Cella M and Colonna M. (2007). Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* **204**, 2561-8.

Bobryshev YV and Lord RS. (1995). Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima. Contacting interactions of Vascular Dendritic Cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Arch Histol Cytol* **58**, 307-22.

Bolton C, Scott GS, Smith T and Flower RJ. (2008). The acute and chronic phases of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) are ameliorated by the peroxynitrite decomposition catalyst, 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinatoiron (III) chloride, (FeTPPS). *Eur J Pharmacol* **601**, 88-93.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P and Lipton SA. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7162-6.

Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC and Steinman RM. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-38.

Bonmort M, Dalod M, Mignot G, Ullrich E, Chaput N and Zitvogel L. (2008). Killer dendritic cells: IKDC and the others. *Curr Opin Immunol* **20**, 558-65.

Bonnotte B, Larmonier N, Favre N, Fromentin A, Moutet M, Martin M, Gurbuxani S, Solary E, Chauffert B and Martin F. (2001). Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system. *J Immunol* **167**, 5077-83.

Bonnotte B, Gough M, Phan V, Ahmed A, Chong H, Martin F and Vile RG. (2003). Intradermal injection, as opposed to subcutaneous injection, enhances immunogenicity and suppresses tumorigenicity of tumor cells. *Cancer Res* **63**, 2145-9.

Bonnotte B, Crittenden M, Larmonier N, Gough M and Vile RG. (2004). MIP-3alpha transfection into a rodent tumor cell line increases intratumoral dendritic cell infiltration but enhances (facilitates) tumor growth and decreases immunogenicity. *J Immunol* **173**, 4929-35.

Brito C, Naviliat M, Tiscornia AC, Vuillier F, Gualco G, Dighiero G, Radi R and Cayota AM. (1999). Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J Immunol* **162**, 3356-66.

Brocker T, Riedinger M and Karjalainen K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* **185**, 541-50.

Brown ML, Inazu A, Hesler CB, Agellon LB, Mann C, Whitlock ME, Marcel YL, Milne RW, Koizumi J, Mabuchi H, Takeda R and Tall AR. (1989). Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high-density lipoproteins. *Nature* **342**, 448-51.

Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH and Lichtman AH. (2005). T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1596-601.

Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaplan DH and Hogquist KA. (2007). Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 3147-56.

Byrne GI and Kalayoglu MV. (1999). Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: links to the disease process. *Am Heart J* **138**, S488-90.

C

Caminschi I, Ahmet F, Heger K, Brady J, Nutt SL, Vremec D, Pietersz S, Lahoud MH, Schofield L, Hansen DS, O'Keeffe M, Smyth MJ, Bedoui S, Davey GM, Villadangos JA, Heath WR and Shortman K. (2007). Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 2579-90.

Cao T, Ueno H, Glaser C, Fay JW, Palucka AK and Banchereau J. (2007). Both Langerhans cells and interstitial DC cross-present melanoma antigens and efficiently activate antigen-specific CTL. *Eur J Immunol* **37**, 2657-67.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I and Banchereau J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* **180**, 1263-72.

Cazita PM, Barbeiro DF, Moretti AI, Quintão EC, Soriano FG. (2008). Human cholesteryl ester transfer protein expression enhances the mouse survival rate in an experimental systemic inflammation model: a novel role for CETP. *Shock* **30(5)**:590-5.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J and Lanzavecchia A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-7.

Chhabra A, Chakraborty NG and Mukherji B. (2008). Silencing of endogenous IL-10 in human dendritic cells leads to the generation of an improved CTL response against human melanoma associated antigenic epitope, MART-1 27-35. *Clin Immunol* **126**, 251-9.

Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, Brockstedt D, Dubensky TW, Stins MF, Lanier LL, Pardoll DM and Housseau F. (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* **12**, 207-13.

Chan CW and Housseau F. (2008). The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ* **15**, 58-69.

Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP and Plumas J. (2006). Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **176**, 248-55.

Chapoval AI, Tamada K and Chen L. (2000). In vitro growth inhibition of a broad spectrum of tumor cell lines by activated human dendritic cells. *Blood* **95**, 2346-51.

Chaput N, Conforti R, Viaud S, Spatz A and Zitvogel L. (2008). The Janus face of dendritic cells in cancer. *Oncogene* **27**, 5920-31.

Chaudhry UI, Kingham TP, Plitas G, Katz SC, Raab JR and DeMatteo RP. (2006). Combined stimulation with interleukin-18 and CpG induces murine natural killer dendritic cells to produce IFN-gamma and inhibit tumor growth. *Cancer Res* **66**, 10497-504.

Chaudhry UI, Katz SC, Kingham TP, Pillarisetty VG, Raab JR, Shah AB and DeMatteo RP. (2006). In vivo overexpression of Flt3 ligand expands and activates murine spleen natural killer dendritic cells. *FASEB J* **20**, 982-4.

Chauvin C and Josien R. (2008). Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles. *J Immunol* **181**, 11-6.

Chauvin C, Philippeau JM, Hémont C, Hubert FX, Wittrant Y, Lamoureux F, Trinité B, Heymann D, Rédini F and Josien R. (2008). Killer dendritic cells link innate and adaptive immunity against established osteosarcoma in rats. *Cancer Res* **68**, 9433-40.

Chaux P, Favre N, Martin M and Martin F. (1997). Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. *Int J Cancer* **72**, 619-24.

Chaux P, Favre N, Bonnotte B, Moutet M, Martin M and Martin F. (1997). Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression. A role in the immune tolerance to antigenic tumors. *Adv Exp Med Biol* **417**, 525-8.

Chorro L, Sarde A, Li M, Woollard KJ, Chambon P, Malissen B, Kissenpfennig A, Barbaroux JB, Groves R and Geissmann F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med* **206**, 3089-100.

Cluff CW. (2009). Monophosphoryl lipid A (MPL) as an adjuvant for anti-cancer vaccines: clinical results. *Adv Exp Med Biol* **667**, 111-23.

Colonna M, Trinchieri G and Liu YJ. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-26.

Conroy H, Marshall NA and Mills KH. (2008). TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours. *Oncogene* **27**, 168-80.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF and Berneman ZN. (2007) Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* **82**, 1365-74.

Coquerelle C and Moser M. (2010). DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev* **234**, 317-34.

Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre CA, Ventre E, Vu Manh TP, Bararnek T, Storset AK, Marvel J, Boudinot P, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*. 207(6):1283-92.

Curiel TJ. (2007). Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest* **117**, 1167-74.

Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O and Tarkowski A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* **65**, 109-21.

D

Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, Zhang A, Dahm P, Chao N, Gilboa E and Vieweg J. (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* **115**, 3623-33.

De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O and Moser M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* **184**, 1413-24.

De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JH, Van Muijen GN, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJ, Adema GJ, Punt CJ and Figdor CG. (2003). Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* **63**, 12-7.

De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H and de Vries JE. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* **174**, 915-24.

Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, Clerici M, Greco M and Villa ML. (2003). Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* **89**, 1463-72.

den Haan JM, Lehar SM and Bevan MJ. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* **192**, 1685-96.

Diao J, Zhao J, Winter E and Cattral MS. (2010). Recruitment and differentiation of conventional dendritic cell precursors in tumors. *J Immunol* **184**, 1261-7.

Dikalov SI, Li W, Mehranpour P, Wang SS and Zafari AM. (2007). Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay. *Biochem Pharmacol* **73**, 972-80.

Dillman RO, Selvan SR and Schiltz PM. (2006). Patient-specific dendritic-cell vaccines for metastatic melanoma. *N Engl J Med* **355**, 1179-81.

Donini M, Zenaro E, Tamassia N and Dusi S. (2007). NADPH oxidase of human dendritic cells: role in *Candida albicans* killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur J Immunol* **37**, 1194-203.

Dougan M and Dranoff G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* **27**, 83-117.

Dowling D, Hamilton CM and O'Neill SM. (2008). A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands. *Cytokine* **41**, 254-62.

Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding C and Lawn R. (1987). Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. *Nature* **327**, 632-4.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ and Schreiber RD. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-8.

Dunn GP, Old LJ and Schreiber RD. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* **22**, 329-60.

Duplain H, Sartori C, Dessen P, Jayet PY, Schwab M, Bloch J, Nicod P and Scherrer U. (2008). Stimulation of peroxynitrite catalysis improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *J Physiol* **586**, 4011-6.

Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Günther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y and Schmitz J. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* **194**, 1823-34.

E

Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA and Mosser DM. (2006). Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* **80**, 1298-307.

Ellyard JJ, Simson L and Parish CR. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens* **70**, 1-11.

Enk AH, Jonuleit H, Saloga J and Knop J. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer* **73**, 309-16.

Erdmann M, Dörrie J, Schaft N, Strasser E, Hendelmeier M, Kämpgen E, Schuler G and Schuler-Thurner B. (2007). Effective clinical-scale production of dendritic cell vaccines by monocyte elutriation directly in medium, subsequent culture in bags and final antigen loading using peptides or RNA transfection. *J Immunother* **30**, 663-74.

Erridge C, Bennett-Guerrero E and Poxton IR. (2002). Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* **4**, 837-51.

F

Fanger NA, Maliszewski CR, Schooley K and Griffith TS. (1999). Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med* **190**, 1155-64.

Faust RA, Tollefson JH, Chait A and Albers JJ. (1990). Regulation of LTP-I secretion from human monocyte-derived macrophages by differentiation and cholesterol accumulation in vitro. *Biochim Biophys Acta* **1042**, 404-9.

Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, Perricaudet M, Tursz T, Maraskovsky E and Zitvogel L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med* **5**, 405-11.

Ferrantini M, Capone I and Belardelli F. (2008). Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 93-107.

Fiévet C, Staels B. (2009). Liver X receptor modulators: effects on lipid metabolism and potential use in the treatment of atherosclerosis. *Biochem Pharmacol.* **77(8)**:1316-27.

Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ and Melief CJ. (2004). Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* **10**, 475-80.

Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, Fruchart JC, Staels B and Chinetti-Gbaguidi G. (2007). Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ Res* **101**, 40-9.

Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E and Lipp M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33.

Frantz S, Ertl G and Bauersachs J. (2007). Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4**, 444-54.

Fraszczak J, Trad M, Janikashvili N, Cathelin D, Lakomy D, Granci V, Morizot A, Audia S, Micheau O, Lagrost L, Katsanis E, Solary E, Larmonier N and Bonnotte B. (2010). Peroxynitrite-dependent killing of cancer cells and presentation of released tumor antigens by activated dendritic cells. *J Immunol* **184**, 1876-84.

Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M and Steinman RM. (2002). Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs. *Nat Immunol* **3**, 867-74.

Furumoto K, Soares L, Engleman EG and Merad M. (2004). Induction of potent antitumor immunity by in situ targeting of intratumoral DCs. *J Clin Invest* **113**, 774-83.

G

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D and Carbone DP. (1996) Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* **2**, 1096-103. Erratum in: *Nat Med* **2**, 1267.

Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D and Carbone DP. (1997). Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **3**, 483-90.

Galkina E and Ley K. (2007). Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2292-301.

Galkina E and Ley K. (2009). Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* **27**, 165-97.

Gallucci S, Lolkema M and Matzinger P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1249-55.

Gauthier B, Robb M and McPherson R. (1999). Cholesteryl ester transfer protein gene expression during differentiation of human preadipocytes to adipocytes in primary culture. *Atherosclerosis* **142**, 301-7.

Gautier T, Paul C, Deckert V, Desrumaux C, Klein A, Labbé J, Le Guern N, Athias A, Monier S, Hammann A, Bettaieb A, Jeannin JF, Lagrost L. (2010). Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J.* **24(9)**:3544-54.

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y and Figdor CG. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575-85.

Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA and van Kooyk Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **22**, 33-54.

Gerrity RG and Naito HK. (1980). Ultrastructural identification of monocyte-derived foam cells in fatty streak lesions. *Artery* **8**, 208-14.

Gerlini G, Tun-Kyi A, Dudli C, Burg G, Pimpinelli N and Nestle FO. (2004). Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. *Am J Pathol* **165**, 1853-63.

Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G and Trinchieri G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* **195**, 327-33.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B and Zitvogel L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* **202**, 919-29.

Gilboa E. (2007). DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* **117**, 1195-203.

Gordon S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23-35.

Gordon S and Taylor PR. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-64.

Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, Roncarolo MG. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* **116**, 935-44.

Groux H, Bigler M, de Vries JE and Roncarolo MG. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* **184**, 19-29.

Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR and Fanger NA. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* **189**, 1343-54.

Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C and Amigorena S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **20**, 621-67.

H

Hansson GK, Holm J and Jonasson L. (1989). Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* **135**, 169-75.

Hansson GK and Libby P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **6**, 508-19.

Hardy AW, Graham DR, Shearer GM and Herbeuval JP. (2007). HIV turns plasmacytoid dendritic cells (DCp) into TRAIL-expressing killer DCp and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17453-8.

Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, Giese T, Gires O, Endres S and Hartmann G. (2003). Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. *Cancer Res* **63**, 6478-87.

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM and Nussenzweig MC. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **194**, 769-79.

Hayek T, Masucci-Magoulas L, Jiang X, Walsh A, Rubin E, Breslow JL and Tall AR. (1995). Decreased early atherosclerotic lesions in hypertriglyceridemic mice expressing cholesteryl ester transfer protein transgene. *J Clin Invest* **96**, 2071-4.

He G, Samouilov A, Kuppusamy P and Zweier JL. (2002). In vivo imaging of free radicals: applications from mouse to man. *Mol Cell Biochem* **234-235**, 359-67.

Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR and Villadangos JA. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* **199**, 9-26.

Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E and Vieweg J. (2002). Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest* **109**, 409-17.

Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N and Schuler G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates

T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* **26**, 659-68.

Hill KS, Errington F, Steele LP, Merrick A, Morgan R, Selby PJ, Georgopoulos NT, O'Donnell DM and Melcher AA. (2008). OK432-activated human dendritic cells kill tumor cells via CD40/CD40 ligand interactions. *J Immunol* **181**, 3108-15.

Hiltbold EM, Vlad AM, Ciborowski P, Watkins SC and Finn OJ. (2000). The mechanism of unresponsiveness to circulating tumor antigen MUC1 is a block in intracellular sorting and processing by dendritic cells. *J Immunol* **165**, 3730-41.

Himoudi N, Yan M, Bouma G, Morgenstern D, Wallace R, Seddon B, Buddle J, Eddaoudi A, Howe SJ, Cooper N and Anderson J. (2009). Migratory and antigen presentation functions of IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res* **69**, 6598-606.

Huang J, Tatsumi T, Pizzoferrato E, Vujanovic N and Storkus WJ. (2005). Nitric oxide sensitizes tumor cells to dendritic cell-mediated apoptosis, uptake, and cross-presentation. *Cancer Res* **65**, 8461-70.

Hubert P, Giannini SL, Vanderplasschen A, Franzen-Detrooz E, Jacobs N, Boniver J and Delvenne P. (2001). Dendritic cells induce the death of human papillomavirus-transformed keratinocytes. *FASEB J* **15**, 2521-3.

I

Ishikawa Y, Ito K, Akasaka Y, Ishii T, Masuda T, Zhang L, Akishima Y, Kiguchi H, Nakajima K and Hata Y. (2001). The distribution and production of cholesteryl ester transfer protein in the human aortic wall. *Atherosclerosis* **156**, 29-37.

Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M and Tanigawa N. (2003). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* **104**, 92-7.

J

Jales A, Falahati R, Mari E, Stemmy EJ, Shen W, Southammakosane C, Herzog D, Ladisch S and Leitenberg D. (2010). Ganglioside-exposed dendritic cells inhibit T-cell effector function by promoting regulatory cell activity. *Immunology* doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03348.

Janikashvili N, Larmonier N and Katsanis E. (2010). Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. *Immunotherapy* **2**, 57-68.

Janjic BM, Lu G, Pimenov A, Whiteside TL, Storkus WJ and Vujanovic NL. (2002). Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J Immunol* **168**, 1823-30.

Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM and Nussenzweig MC. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-5.

Johnson DA. (2008). Synthetic TLR4-active glycolipids as vaccine adjuvants and stand-alone immunotherapeutics. *Curr Top Med Chem* **8**, 64-79.

Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, Chen CJ, Dunbar PR, Wadley RB, Jeet V, Vulink AJ, Hart DN, Radford KJ (2010). HumanCD141+ (BDCA-3+) dendritic cells represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med.* 207(6):1247-60.

Joo HG, Fleming TP, Tanaka Y, Dunn TJ, Linehan DC, Goedegebuure PS and Eberlein TJ. (2002). Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors. *Int J Cancer* **102**, 20-8.

Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ and Tontonoz P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* **9**, 213-9.

Josien R, Heslan M, Soullillou JP and Cuturi MC. (1997). Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca²⁺-dependent mechanism. *J Exp Med* **186**, 467-72.

Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C and Rieger C. (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* **159**, 197-207.

K

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F and Liu YJ. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-9.

Kalinski P, Mailliard RB, Giermasz A, Zeh HJ, Basse P, Bartlett DL, Kirkwood JM, Lotze MT and Herberman RB. (2005). Natural killer-dendritic cell cross-talk in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 1303-15.

Kapsenberg ML. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984-93.

Kerrigan AM and Brown GD. (2010). Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev* **234**, 335-52.

Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA and Abbas AK. (2005). Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* **202**, 1375-86.

Koski GK, Cohen PA, Roses RE, Xu S and Czerniecki BJ. (2008). Reengineering dendritic cell-based anti-cancer vaccines. *Immunol Rev* **222**, 256-76.

Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC and von Boehmer H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* **6**, 1219-27.

Kroemer G and Zitvogel L. (2007). Death, danger, and immunity: an infernal trio. *Immunol Rev* **220**, 5-7.

Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D and Gabrilovich DI. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* **172**, 989-99. Erratum in: *J Immunol* 2004 **172**, 4647.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG and Dikalov S. (2005). Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Pharmacol* **70**, 343-54.

L

Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C and Nevieri R. (2004). Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol* **43**, 2348-58.

Larmonier N, Mérino D, Nicolas A, Cathelin D, Besson A, Bateman A, Solary E, Martin F, Katsanis E and Bonnotte B. (2006). Apoptotic, necrotic, or fused tumor cells: an equivalent source of antigen for dendritic cell loading. *Apoptosis* **11**, 1513-24.

Larmonier N, Marron M, Zeng Y, Cantrell J, Romanoski A, Sepassi M, Thompson S, Chen X, Andreansky S and Katsanis E. (2007). Tumor-derived CD4(+)CD25(+) regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-beta and IL-10. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 48-59.

Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, Bonnotte B and Katsanis E. (2010). Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **59**, 1-11.

Lauzier B, Sicard P, Bouchot O, Delemasure S, Moreau D, Vergely C and Rochette L. (2007). A peroxynitrite decomposition catalyst: FeTPPS confers cardioprotection during reperfusion after cardioplegic arrest in a working isolated rat heart model. *Fundam Clin Pharmacol* **21**, 173-80.

Li X, Jiang S and Tapping RI. (2010). Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* **49**, 1-9.

Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ and Folco E. (2010). Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* **74**, 213-20.

Liu E, Tu W, Law HK and Lau YL. (2001). Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br J Haematol* **113**, 240-6.

Liu J, Xiang Z and Ma X. (2004). Role of IFN regulatory factor-1 and IL-12 in immunological resistance to pathogenesis of N-methyl-N-nitrosourea-induced T lymphoma. *J Immunol* **173**, 1184-93. Erratum in: *J Immunol* **173**, following 6489.

Liu K and Nussenzweig MC. (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* **234**, 45-54.

Liu K and Nussenzweig MC. (2010) Development and homeostasis of dendritic cells. *Eur J Immunol* **40**, 2099-102.

Liu S, Yu Y, Zhang M, Wang W and Cao X. (2001). The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J Immunol* **166**, 5407-15.

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS and Linehan DC. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* **169**, 2756-61.

Loser K, Scherer A, Krummen MB, Varga G, Higuchi T, Schwarz T, Sharpe AH, Grabbe S, Bluestone JA and Beissert S. (2005). An important role of CD80/CD86-CTLA-4 signaling during photocarcinogenesis in mice. *J Immunol* **174**, 5298-305.

Lu G, Janjic BM, Janjic J, Whiteside TL, Storkus WJ and Vujanovic NL. (2002). Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Immunol* **168**, 1831-9.

Lu L, Qian S, Hersherberger PA, Rudert WA, Lynch DH and Thomson AW. (1997). Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* **158**, 5676-84.

Lu W, Arraes LC, Ferreira WT and Andrieu JM. (2004). Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* **10**, 1359-65.

Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P and Diefenbach A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* **26**, 503-17.

Luo Y and Tall AR. (2000). Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* **105**, 513-20.

M

Mach N, Gillessen S, Wilson SB, Sheehan C, Mihm M and Dranoff G. (2000). Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res* **60**, 3239-46.

Manna PP and Mohanakumar T. (2002). Human dendritic cell mediated cytotoxicity against breast carcinoma cells in vitro. *J Leukoc Biol* **72**, 312-20.

Mantovani A, Sica A and Locati M. (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**, 344-6.

Mantovani A, Garlanda C and Locati M. (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1419-23.

Martin-Fuentes P, Civeira F, Recalde D, Garcia-Otin AL, Jarauta E, Marzo I and Cenarro A. (2007). Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. *J Immunol* **179**, 3242-8.

Martinez FO, Sica A, Mantovani A and Locati M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* **13**, 453-61.

Martinon F and Tschopp J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* **26**, 447-54.

Masson D, Jiang XC, Lagrost L and Tall AR. (2009). The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* **50**, S201-6.

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, et al. (1995). Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med* **1**, 1297-302.

McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, Maraskovsky E, Maliszewski CR, Lynch DH, Smith J, Pulendran B, Roux ER, Teepe M, Lyman SD and Peschon JJ. (2000) Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-97.

Mellor AL, Baban B, Chandler P, Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M and Munn DH. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* **171**, 1652-5.

Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C and Blay JY. (1998). Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4778-91.

Morton RE. (1988). Interaction of plasma-derived lipid transfer protein with macrophages in culture. *J Lipid Res* **29**, 1367-77.

Mosier DE. (1967) A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. *Science* **158**, 1573-5.

Mosser DM and Edwards JP. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-69. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2010 **10**, 460.

Munn DH, Mellor AL, Rossi M and Young JW. (2005). Dendritic cells have the option to express IDO-mediated suppression or not. *Blood* **105**, 2618.

N

Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J and Gabrilovich DI. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med* **13**, 828-35.

Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M and Shortman K. (2006). Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* **7**, 663-71.

Nair S, McLaughlin C, Weizer A, Su Z, Boczkowski D, Dannull J, Vieweg J and Gilboa E. (2003). Injection of immature dendritic cells into adjuvant-treated skin obviates the need for ex vivo maturation. *J Immunol* **171**, 6275-82.

Neidhardt-Berard EM, Berard F, Banchereau J and Palucka AK. (2004). Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res* **6**, R322-8.

Nestle FO, Burg G, Föh J, Wrone-Smith T and Nickoloff BJ. (1997). Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T cell co-stimulatory molecules and are impaired as antigen-presenting cells. *Am J Pathol* **150**, 641-51.

Nicolas A, Cathelin D, Larmonier N, Fraszczak J, Puig PE, Bouchot A, Bateman A, Solary E and Bonnotte B. (2007). Dendritic cells trigger tumor cell death by a nitric oxide-dependent mechanism. *J Immunol* **179**, 812-8.

Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J and Palucka KA. (2000). Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* **165**, 3797-803.

Nussenzweig MC, Steinman RM, Gutchinov B and Cohn ZA. (1980) Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **152**, 1070-84.

Nussenzweig MC, Steinman RM, Unkeless JC, Witmer MD, Gutchinov B and Cohn ZA. (1981). Studies of the cell surface of mouse dendritic cells and other leukocytes. *J Exp Med* **154**, 168-87.

O

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L and Kroemer G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**, 54-61.

Ohnmacht C, Pullner A, King SB, Drexler I, Meier S, Brocker T and Voehringer D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* **206**, 549-59.

Ostrand-Rosenberg S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* **59**, 1593-600.

P

Pacher P, Beckman JS and Liaudet L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**, 315-424.

Paczesny S, Ueno H, Fay J, Banchereau J and Palucka AK. (2003). Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol* **13**, 439-47.

Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C and Fridman WH. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**, 1093-102.

Palucka AK, Ueno H, Fay JW and Banchereau J. (2007). Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev* **220**, 129-50.

Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ and Bae YS. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* **173**, 3589-93.

Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q and Dong C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133-41.

Penna G, Vulcano M, Sozzani S and Adorini L. (2002). Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* **63**, 1164-71.

Petersen TR, Dickgreber N and Hermans IF. (2010). Tumor antigen presentation by dendritic cells. *Crit Rev Immunol* **30**, 345-86.

Piccioli D, Sbrana S, Melandri E and Valiante NM. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* **195**, 335-41.

Pillarisetty VG, Katz SC, Bleier JI, Shah AB and Dematteo RP. (2005). Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol* **174**, 2612-8.

Pinzon-Charry A, Ho CS, Laherty R, Maxwell T, Walker D, Gardiner RA, O'Connor L, Pyke C, Schmidt C, Furnival C and López JA. (2005). A population of HLA-DR+ immature cells accumulates in the blood dendritic cell compartment of patients with different types of cancer. *Neoplasia* **7**, 1112-22.

Plump AS, Masucci-Magoulas L, Bruce C, Bisgaier CL, Breslow JL and Tall AR. (1999). Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 1105-10.

Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, nye E, Le Moine A, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerulondo V, Bonnet D, Reis e Sousa C. (2010). Characterization of human DNGR-1+ BDCA-3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 alpha dendritic cells. *J Exp Med.* 207 (6):1261-71.

Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J and Palucka K. (2000) Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* **165**, 566-72.

Pulendran B. (2004). Immune activation: death, danger and dendritic cells. *Curr Biol* 2004 **14**, R30-2.

Q

Qiu X, Mistry A, Ammirati MJ, Chrnyk BA, Clark RW, Cong Y, Culp JS, Danley DE, Freeman TB, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawrylik SJ, Hayward CM, Hensley P, Hoth LR, Karam GA, Lira ME, Lloyd DB, McGrath KM, Stutzman-Engwall KJ, Subashi AK, Subashi TA, Thompson JF, Wang IK, Zhao H and Seddon AP. (2007). Crystal structure of cholesteryl ester transfer protein reveals a long tunnel and four bound lipid molecules. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 106-13.

Quintão EC, Cazita PM. (2010). Lipid transfer proteins: past, present and perspectives. *Atherosclerosis* **209**(1):1-9.

R

Rabinovich GA, Gabrilovich D and Sotomayor EM. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 267-96.

Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J and Rothblat GH. (2009). The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res* **50**, S189-94.

Randolph GJ, Ochando J and Partida-Sánchez S. (2008). Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* **26**, 293-316.

Rosenberg SA, Yang JC and Restifo NP. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* **10**, 909-15.

Rosenblatt J, Kufe D and Avigan D. (2005). Dendritic cell fusion vaccines for cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 703-15.

Ross R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26.

Rossmann A, Henderson B, Heidecker B, Seiler R, Fraedrich G, Singh M, Parson W, Keller M, Grubeck-Loebenstien B and Wick G. (2008). T-cells from advanced atherosclerotic lesions recognize hHSP60 and have a restricted T-cell receptor repertoire. *Exp Gerontol* **43**, 229-37.

Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, Bordignon C and Traversari C. (2000). Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2185-90.

Rutella S, Danese S and Leone G. (2006). Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* **108**, 1435-40.

S

Saeland E, van Vliet SJ, Bäckström M, van den Berg VC, Geijtenbeek TB, Meijer GA and van Kooyk Y. (2007). The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1225-36.

Saito H, Dubsky P, Dantin C, Finn OJ, Banchereau J and Palucka AK. (2006). Cross-priming of cyclin B1, MUC-1 and survivin-specific CD8+ T cells by dendritic cells loaded with killed allogeneic breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **8**, R65.

Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P and Yamaguchi T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* **21**, 1105-11.

Sallusto F and Lanzavecchia A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-18.

Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T and Belardelli F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived *Med* **191**, 1777-88.

Sassi N, Paul C, Martin A, Bettaieb A and Jeannin JF. (2009). Lipid A-induced responses in vivo. *Adv Exp Med Biol* **667**, 69-80.

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S and Bhardwaj N. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* **191**, 423-34.

Scaffidi P, Misteli T and Bianchi ME. (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191-5. Erratum in: *Nature* 2010 **467**, 622.

Scarpino S, Stoppacciaro A, Ballerini F, Marchesi M, Prat M, Stella MC, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A and Ruco LP. (2000). Papillary carcinoma of the thyroid: hepatocyte growth factor (HGF) stimulates tumor cells to release chemokines active in recruiting dendritic cells. *Am J Pathol* **156**, 831-7.

Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, Nestle FO, Enk A, Bröcker EB, Grabbe S, Rittgen W, Edler L, Sucker A, Zimpfer-Rechner C, Berger T, Kamarashev J, Burg G, Jonuleit H, Tüttenberg A, Becker JC, Keikavoussi P, Kämpgen E and Schuler G; DC study group of the DeCOG. (2006). Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* **17**, 563-70.

Schmitz M, Zhao S, Deuse Y, Schäkel K, Wehner R, Wöhner H, Hölig K, Wienforth F, Kiessling A, Bornhäuser M, Temme A, Rieger MA, Weigle B, Bachmann M and Rieber EP. (2005). Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **174**, 4127-34.

Schuler G and Steinman RM. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* **161**, 526-46.

Schuler G, Schuler-Thurner B and Steinman RM. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **15**, 138-47.

Schuler G. (2010). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol* **40**, 2123-30.

Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C, Jonuleit H, Röder C, Haendle I, Leisgang W, Dunbar R, Cerundolo V, von Den Driesch P, Knop J, Bröcker EB, Enk A, Kämpgen E and Schuler G. (2000). Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A2.1+ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **165**, 3492-6.

Seo N, Hayakawa S, Takigawa M and Tokura Y. (2001). Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4(+) T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* **103**, 449-57.

Serbina NV, Kuziel W, Flavell R, Akira S, Rollins B and Pamer EG. (2003). Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. *Immunity* **19**, 891-901.

Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA and Pamer EG. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70.

Shi J, Ikeda K, Fujii N, Kondo E, Shinagawa K, Ishimaru F, Kaneda K, Tanimoto M, Li X and Pu Q. (2005). Activated human umbilical cord blood dendritic cells kill tumor cells without damaging normal hematological progenitor cells. *Cancer Sci* **96**, 127-33.

Shibaki A and Katz SI. (2001). Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells. *Eur J Immunol* **31**, 3006-15.

Shimamura H, Cumberland R, Hiroishi K, Watkins SC, Lotze MT and Baar J. (2002). Murine dendritic cell-induced tumor apoptosis is partially mediated by nitric oxide. *J Immunother* **25**, 226-34.

Shimizu K, Kurosawa Y, Taniguchi M, Steinman RM and Fujii S. (2007). Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 2641-53.

Shortman K and Liu YJ. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-61.

Shortman K and Villadangos JA. (2006). Is it a DC, is it an NK? No, it's an IKDC. *Nat Med* **12**, 167-8.

Simon T, Fonteneau JF and Grégoire M. (2009). Dendritic cell preparation for immunotherapeutic interventions. *Immunotherapy* **1**, 289-302.

Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Rubini C, Stramazzotti D, Lo Muzio L, Biagini G and Offidani A. (2007). In melanoma changes of immature and mature dendritic cell expression correlate with tumor thickness: an immunohistochemical study. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**, 325-33.

Singh-Jasuja H, Emmerich NP and Rammensee HG. (2004). The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 187-95.

Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, Jung K, Gillessen S, Singer S, Tanabe K, Duda R, Mentzer S, Jaklitsch M, Bueno R, Clift S, Hardy S, Neuberg D, Mulligan R, Webb I, Mihm M and Dranoff G. (2003). Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* **21**, 3343-50.

Sozzani S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 581-92.

Spits H and Lanier LL. (2007). Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity* **26**, 11-6.

Srivastava RM, Varalakshmi Ch and Khar A. (2007). Cross-linking a mAb to NKR-P2/NKG2D on dendritic cells induces their activation and maturation leading to enhanced anti-tumor immune response. *Int Immunol* **19**, 591-607.

Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T and Stingl G. (2007). Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 1441-51.

Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, and Enk AH. (1997). Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* **159**, 4772-80.

Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J and Enk AH. (2002). CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468-76.

Steinman RM and Cohn ZA. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-62.

Steinman RM, Lustig DS and Cohn ZA. (1974). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J Exp Med* **139**, 1431-45.

Steinman RM and Witmer MD. (1978) Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 5132-6.

Steinman RM, Hawiger D and Nussenzweig MC. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 685-711.

Steinman RM and Banchereau J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-26.

Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E and Vieweg J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res* **63**, 2127-33.

Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E and Vieweg J. (2005). Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* **174**, 3798-807.

Süss G and Shortman K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* **183**, 1789-96.

Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M and Kasajima T. (2002). Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol* **196**, 37-43.

Swiecki M and Colonna M. (2010). Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* **234**, 142-62.

T

Tacken PJ, de Vries IJ, Torensma R and Figdor CG. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* **7**, 790-802.

Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, Lafaille JJ and Dustin ML. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **203**, 505-11.

Taieb J, Chaput N, Ménard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, Péquignot M, Casares N, Terme M, Flament C, Opolon P, Lecluse Y, Métivier D, Tomasello E, Vivier E, Ghiringhelli F, Martin F, Klatzmann D, Poynard T, Tursz T, Raposo G, Yagita H, Ryffel B, Kroemer G and Zitvogel L. (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* **12**, 214-9.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**, 443-51.

Tarpey MM, Wink DA and Grisham MB. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **286**, R431-44.

Tatsumi T, Huang J, Gooding WE, Gambotto A, Robbins PD, Vujanovic NL, Alber SM, Watkins SC, Okada H and Storkus WJ. (2003). Intratumoral delivery of dendritic cells engineered to secrete both interleukin (IL)-12 and IL-18 effectively treats local and distant disease in association with broadly reactive Tc1-type immunity. *Cancer Res* **63**, 6378-86.

Thurner B, Haendle I, Röder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Bröcker EB, Steinman RM, Enk A, Kämpgen E and Schuler G. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**, 1669-78.

Tollefson JH, Faust R, Albers JJ and Chait A. (1985). Secretion of a lipid transfer protein by human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **260**, 5887-90.

Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C and Lebecque S. (2004). Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 7466-74.

Trinité B, Voisine C, Yagita H and Josien R. (2000). A subset of cytolytic dendritic cells in rat. *J Immunol* **165**, 4202-8.

Trinité B, Chauvin C, Pêche H, Voisine C, Heslan M and Josien R. (2005). Immature CD4-CD103+ rat dendritic cells induce rapid caspase-independent apoptosis-like cell death in various tumor and nontumor cells and phagocytose their victims. *J Immunol* **175**, 2408-17.

Triozi PL, Khurram R, Aldrich WA, Walker MJ, Kim JA and Jaynes S. (2000). Intratumoral injection of dendritic cells derived in vitro in patients with metastatic cancer. *Cancer* **89**, 2646-54.

Trogan E, Feig JE, Dogan S, Rothblat GH, Angeli V, Tacke F, Randolph GJ and Fisher EA. (2006). Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3781-6.

Trombetta ES and Mellman I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* **23**, 975-1028.

Troy A, Davidson P, Atkinson C and Hart D. (1998). Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol* **160**, 214-9.

Troy AJ, Summers KL, Davidson PJ, Atkinson CH and Hart DN. (1998). Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **4**, 585-93.

U

Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK and Banchereau J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* **219**, 118-42.

Ullrich E, Chaput N and Zitvogel L. (2008). Killer dendritic cells and their potential role in immunotherapy. *Horm Metab Res* **40**, 75-81.

V

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Vincent C, Schmitt D, Davoust J, Caux C, Lebecque S and Saeland S. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* **12**, 71-81.

Van Eck M, Ye D, Hildebrand RB, Kar Kruijt J, de Haan W, Hoekstra M, Rensen PC, Ehnholm C, Jauhainen M and Van Berkel TJ. (2007). Important role for bone marrow-derived cholesteryl ester transfer protein in lipoprotein cholesterol redistribution and atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice. *Circ Res* **100**, 678-85

Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR and Berneman ZN. (2001). Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* **98**, 49-56.

Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM and Kaplan G. (1982). Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* **155**, 1172-87.

Vanderheyde N, Aksoy E, Amraoui Z, Vandenabeele P, Goldman M and Willems F. (2001). Tumoricidal activity of monocyte-derived dendritic cells: evidence for a caspase-8-dependent, Fas-associated death domain-independent mechanism. *J Immunol* **167**, 3565-9.

Vanderheyde N, Vandenabeele P, Goldman M and Willems F. (2004). Distinct mechanisms are involved in tumoristatic and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Lett* **91**, 99-101.

Vidalain PO, Azocar O, Lamouille B, Astier A, Rabourdin-Combe C and Servet-Delprat C. (2000). Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol* **74**, 556-9.

Vidalain PO, Azocar O, Yagita H, Rabourdin-Combe C and Servet-Delprat C. (2001). Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand. *J Immunol* **167**, 3765-72.

Vignali D. (2008). How many mechanisms do regulatory T cells need? *Eur J Immunol* **38**, 908-11.

Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, Sanvito F, Ponzoni M, Valentinis B, Bregni M, Prinetti A, Steffensen KR, Sonnino S, Gustafsson JA, Doglioni C, Bordignon C, Traversari C and Russo V. (2010). Tumor-mediated liver X receptor- α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat Med* **16**, 98-105.

Virág L, Szabó E, Gergely P and Szabó C. (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* **140-141**, 113-24.

von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG and Schultze JL. (2006). CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* **108**, 228-37.

Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Hasan M, Richard-Le Goff O, Corcuff E, Mandelboim O and Di Santo JP. (2007). CD11cI-B220+ interferon-producing **204**, 2569-78.

Vulcano M, Dusi S, Lissandrini D, Badolato R, Mazzi P, Riboldi E, Borroni E, Calleri A, Donini M, Plebani A, Notarangelo L, Musso T and Sozzani S. (2004). Toll receptor-mediated regulation of NADPH oxidase in human dendritic cells. *J Immunol* **173**, 5749-56.

W

Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L and Vivier E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**, 2252-8.

Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH and Noelle RJ. (2008). Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9331-6.

Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D and Yu H. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* **10**, 48-54. Erratum in: *Nat Med* **10**, 209.

Wertel I, Bednarek W, Stachowicz N, Rogala E, Nowicka A and Kotarski J. (2010). Phenotype of dendritic cells generated from peripheral blood monocytes of patients with ovarian cancer. *Transplant Proc* **42**, 3301-5.

Wesa AK and Storkus WJ. (2008). Killer dendritic cells: mechanisms of action and therapeutic implications for cancer. *Cell Death Differ* **15**, 51-7.

Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G and Xu Q. (1997). Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J* **11**, 1199-207.

Wick G, Knoflach M and Xu Q. (2004). Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* **22**, 361-403.

Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA and Mangelsdorf DJ. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* **9**, 1033-45.

Wilson HM. (2010). Macrophages heterogeneity in atherosclerosis - implications for therapy. *J Cell Mol Med* **14**, 2055-65.

Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S and Zitvogel L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **7**, 297-303.

Wu L and Liu YJ. (2007) Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* **26**, 741-50.

Y

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K and Akira S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-3.

Yang R, Xu D, Zhang A and Gruber A. (2001). Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. *Int J Cancer* **94**, 407-13.

Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H and Fu YX. (2003). Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med* **197**, 985-95.

Yu Y, Liu S, Wang W, Song W, Zhang M, Zhang W, Qin Z and Cao X. (2002). Involvement of tumour necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand in enhanced cytotoxicity of lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells to activated T cells. *Immunology* **106**, 308-15.

Yvan-Charvet L, Ranalletta M, Wang N, Han S, Terasaka N, Li R, Welch C and Tall AR. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* **117**, 3900-8.

Z

Zelcer N and Tontonoz P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest* **116**, 607-14.

Zhang Z, Yamashita S, Hirano K, Nakagawa-Toyama Y, Matsuyama A, Nishida M, Sakai N, Fukasawa M, Arai H, Miyagawa J and Matsuzawa Y. (2001). Expression of cholesteryl ester transfer protein in human atherosclerotic lesions and its implication in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **159**, 67-75.

Zhou X, Paulsson G, Stemme S and Hansson GK. (1998). Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *J Clin Invest* **101**, 1717-25.

Zitvogel L, Mignot G, Bonmort M, Ullrich E and Chaput N. (2008). IKDC: killer dendritic cells or antigen-presenting NK cells? *Med Sci (Paris)* **24**, 525-8.

Zou W and Restifo NP. (2010). T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **10**, 248-56.

